

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik
der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Untersuchung entfernt lokalisierter Gewebeproben kutaner B-Zell-Lymphome auf intraklonale Diversität mit der Einzel-Zell-PCR-Technik

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Claudia Jacobs

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr. S. Jahn
 2. PD Dr. L. Cerroni
 3. PD Dr. med. J. Prinz

eingereicht: 22.12.1999

Datum der Promotion: 17.07.2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	PRIMÄR KUTANE B-ZELL-LYMPHOME	5
1.2	KLASSIFIKATION DER KUTANEN B-ZELL-LYMPHOME	6
1.2.1	KUTANE B-ZELL-LYMPHOME MIT INDOLENTEM KLINISCHEN ERSCHEINUNGSBILD	7
1.2.1.1	Kutanes Keimzentrumszell-Lymphom	7
1.2.1.2	Kutanes Immunozytom/Marginalzonen-B-Zell-Lymphom	8
1.2.2	KUTANE B-ZELL-LYMPHOME MIT INTERMEDIÄREM KLINISCHEN VERLAUF	9
1.2.2.1	Großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität	9
1.2.3	KUTANE B-ZELL-LYMPHOME MIT PROVISORISCHER DEFINITION	10
1.2.3.1	Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom	10
1.2.3.2	Kutanes Plasmozytom	10
1.3	STRUKTUR DES ANTIKÖRPERMOLEKÜLS UND DER IMMUNGLOBULINGENE	11
1.4	VIELFALT DER HUMORALEN IMMUNANTWORT - ANTIKÖRPERDIVERSITÄT	13
1.5	DIE ENTWICKLUNG DER B-LYMPHOZYTEN/LYMPHOPOESE DER B-ZELLEN	16
1.6	MERKMALE MALIGNER B-ZELLPROLIFERATIONEN/KLONALITÄT	18
1.7	TECHNIKEN ZUM KLONALITÄTSNACHWEIS	19
2	AUFGABENSTELLUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	PATIENTENAUSWAHL	24
3.1.1	PATIENT WS	24
3.1.2	PATIENT LB	26
3.2	VERWENDETE GERÄTE, REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	28
3.2.1	PRÄPARATEFÄRBUNG	29
3.2.2	MIKROMANIPULATION	29
3.2.3	PROTEINASE-VERDAU UND POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	29
1.2.4	GELELEKTROPHORESE	30
1.2.5	REINIGUNG DER PCR-PRODUKTE, ISOLIERUNG DER DNA-FRAGMENTE	30
1.2.6	SEQUENZIERUNG	30

3.3	METHODEN	31
3.3.1	ENTNAHMESTELLEN DES TUMORMATERIALS	31
3.3.2	SCHNITT UND ANFÄRBUNG DER BIOPSIEN	32
3.3.3	MIKROMANIPULATION DER EINZELZELLEN	32
3.3.4	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR) DER EINZELZELLEN	33
3.3.5	GELELEKTROPHORESE UND REINIGUNG DER PCR-PRODUKTE	38
3.3.6	DIREKTSEQUENZIERUNG DER PCR-PRODUKTE	39
4	ERGEBNISSE	41
4.1	SEQUENZANALYSEN DER TUMORZELLEN DES PATIENTEN WS	41
4.1.1	LYMPHOMZELLANALYSE DES PATIENTEN WS	41
4.1.2	MUTATIONSANALYSE DER V-KAPPA-IMMUNGLOBULINGENE DES PATIENTEN WS	42
4.2	SEQUENZANALYSEN DER TUMORZELLEN DES PATIENTEN LB	47
4.2.1	LYMPHOMZELLANALYSE DES PATIENTEN LB	47
4.2.2	MUTATIONSANALYSE DER VH-IMMUNGLOBULINGENE DES PATIENTEN LB	50
4.2.3	MUTATIONSANALYSE DER V λ -IMMUNGLOBULINGENE DES PATIENTEN LB	51
5	DISKUSSION	56
5.1	INTRAKLONALE DIVERSITÄT	61
5.2	STATISTISCHE MUTATIONSANALYSEN	65
5.1	METHODE	72
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	77
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
ANHANG		84
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG		84
DANKSAGUNG		85
LEBENS LAUF		86
VERÖFFENTLICHUNGEN		87

1 Einleitung

1.1 Primär kutane B-Zell-Lymphome

Kutane maligne B-Zell-Lymphome sind autonome Proliferationen von B-Lymphozyten der Haut (1). Die Inzidenz der primär kutanen Lymphome ist mit 0,5-1/100.000 pro Jahr eher gering, dennoch stellt diese Erkrankung nach den primär gastrointestinalen Lymphomen die zweithäufigste Gruppe der extranodalen Non-Hodgkin Lymphome (NHL) dar (2). Die primär kutanen B-Zell-Lymphome (PKBZL) machen etwa 30% aller kutanen Lymphome aus. Sie unterscheiden sich bezüglich der Prognose und des klinischen Verhaltens grundlegend von den sekundär die Haut besiedelnden, beispielsweise von den Lymphknoten ausgehenden, Lymphomen (3). So ist bei primärer Manifestation in der Haut die Erkrankung oft jahrelang topographisch begrenzt und als niedrig-maligne einzustufen, während der gleiche histologische Typ bei sekundärer Besiedlung häufig einen fulminanten Verlauf zeigt und als hoch-maligne bezeichnet wird. Unterschiede findet man auch in der Präsenz von Translokationen und in der Expression von Onkogenen (4).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde es notwendig, die primär kutanen Lymphome als eigene Krankheitsgruppe anzusehen und als solche zu klassifizieren.

Die Kiel-Klassifikation wurde 1979 von den systemischen auf die kutanen Lymphome übertragen und 1988 überarbeitet (5). Nur 6 Jahre später folgte eine neue Formulierung, die *Revised European-American Lymphoma Classification* (REAL) (6), die versuchte, eine international anerkannte Basis zu schaffen. In den letzten Jahren sind große Fortschritte in der Immunhistochemie und Molekularbiologie erzielt worden (7), so daß neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Die Abgrenzung echter Lymphome zu chronisch entzündlichen Dermatosen oder zu den sogenannten Pseudolymphomen war allein durch die Histologie nicht sicher zu differenzieren (7-9) und ist heute durch molekularbiologische Techniken (z.B. Southern-Blot, PCR) zumindest teilweise möglich geworden (10;11).

Dies veranlaßte die *Cutaneous Lymphoma Study Group* der EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) erneut eine Klassifikation zu erarbeiten, in der weniger die histologischen Untergruppen, als gut definierte Krankheitsmerkmale beschrieben werden. Die Kombination von klinischen, immunologischen, histologischen und zytogenetischen Merkmalen wurde als Grundlage genommen, die primär kutanen B-Zell-Lymphome neu zu klassifizieren und in definierte Entitäten einzuteilen (12). Die Bestimmung der Klonalität einer

lymphoidzelligen Infiltration in der Haut bzw. deren Gene, die für den Antigenrezeptor kodieren, durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein wesentliches Kriterium zur Bestimmung der Dignität (13).

Diese etablierte molekularbiologische Technik, angewendet auf die einzelne entartete B-Zelle, soll zur Aufklärung der noch unklaren Ätiologie und Pathogenese der kutanen B-Zell-Lymphome beitragen und ist die methodische Grundlage der vorliegenden Arbeit.

1.2 Klassifikation der kutanen B-Zell-Lymphome

Vom „Primär kutanen B-Zell-Lymphom“ wird definitionsgemäß nur gesprochen, wenn zum Zeitpunkt der Diagnose, nach umfassender klinischer Untersuchung und innerhalb der darauf folgenden 6 Monate, keine extrakutane Beteiligung nachweisbar ist (12). Zur klinischen Untersuchung gehören Inspektion und Palpation der Lymphknotenstationen, evtl. eine Biopsie vergrößerter Lymphknoten, Differentialblutbild, Röntgenaufnahme des Thorax, Sonographie- bzw. CT-Untersuchung des Abdomens sowie eine Knochenmarkbiopsie. Die Abwesenheit extrakutaner Manifestation bei Diagnosestellung ist entscheidend für die Prognose und damit für das weitere therapeutische Vorgehen.

Die Priorität der Klassifizierung nach der EORTC ist, eine übersichtliche Einteilung der primären Hautlymphome vom B-Zell-Typ anhand molekularbiologischer, morphologischer und klinischer Charakteristika zu erstellen, um daraus einen Fahrplan für die weitere Behandlung und Prognose ableiten zu können. Die Gruppeneinteilung der verschiedenen Entitäten bezieht neben den histologischen und immunphänotypischen, vor allem klinische Wesensmerkmale der Krankheit mit ein und verzichtet bewußt auf rein histologische Subklassifizierungen, die therapeutisch nicht relevant sind.

Tabelle 1: Einteilung der primär kutanen B-Zell-Lymphome nach der Klassifikation der EORTC

<u>Indolent:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Keimzentrumszell-Lymphom• Immunozytom/Marginalzonen B-Zell-Lymphom
<u>Intermediär:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Großzelliges B-Zell-Lymphom der unteren Extremität
<u>Provisorisch:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom• Plasmozytom

Es fällt auf, daß die Begriffe hoch- und niedrig-maligne Lymphome nicht mehr wie bei früheren Klassifikationen verwendet werden, da sie sich in erster Linie auf die Zellgröße beziehen, jedoch keine klinische Bedeutung im Sinne der neuen Klassifikation haben.

Die primär kutanen B-Zell-Lymphome (PKBZL) wurden aufgrund des unterschiedlichen klinischen Verhaltens in *indolent* oder *intermediär* eingeteilt.

Der Begriff *provisorisch* bezieht sich auf eine Gruppe von Lymphomen, die mehr nach histologischen Merkmalen erstellt wurde, da die Prävalenz sehr gering ist und bisher nicht ausreichte, um sie klinisch hinreichend zu charakterisieren. Laut einer klinischen Studie der *Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group* (DCLWG), in der 626 Patienten mit primär kutanen Lymphomen untersucht wurden, ließen sich über 95% anhand dieser Klassifikation einordnen (12).

1.2.1 Kutane B-Zell-Lymphome mit indolentem klinischen Erscheinungsbild

1.2.1.1 Kutanes Keimzentrumszell-Lymphom

Das kutane Keimzentrumszell-Lymphom (KKZL) ist ein Tumor, der sich aus einer variablen Mischung von neoplastischen Zentrozyten (kleine Zellen mit gekerbten Kernen) und Zentroblasten (große Zellen mit rundlichen Kernen) zusammensetzt. In der aktualisierten Kiel-Klassifikation wurde dieser Lymphomtyp als zentrozytisch/zentroblastisch bezeichnet (5). Die histologische Zusammensetzung hängt wohl eher vom Alter und von der Wachstumsrate der Hauterscheinungen ab. Während in frühen sowie kleinen Läsionen vorwiegend Zentrozyten, wenige Zentroblasten und relativ viele reaktive T-Zellen zu finden sind, erkennt man in großen sowie schnell wachsenden Läsionen eine zunehmende Abnahme der Zentrozyten und reaktiven T-Zellen. Es steigt hingegen der Anteil der großen Zentroblasten, evtl. sind auch Immunoblasten zu finden. In den knotigen oder diffusen Infiltraten, welche die Epidermis durch eine Grenzzone aussparen (2;8), sind neoplastische Keimzentren nicht obligatorisch anzutreffen.

Das primär kutane Keimzentrumszell-Lymphom ist mit einer sehr guten Prognose vereinbar und stellt die häufigste Entität der PKBZL dar. Nach den Ergebnissen der DCLWG machen sie 65% der primär kutanen B-Zell-Lymphome aus und zeigen eine 5 Jahres-Überlebensrate (JÜR) von 97%. Klinisch präsentieren die Patienten nicht-schuppige, einzeln oder gruppiert stehende Knoten, Plaques oder Tumoren, die oft von einem ringförmigen Erythem umgeben sind und bevorzugt an Kopf, Hals oder Stamm auftreten. Ein über Jahre zu beobachtender

Krankheitsverlauf mit langsamem Wachstum ist häufig, eine extrakutane Disseminierung dagegen äußerst selten (14).

Die Immunhistochemie zeigt, daß die Tumorzellen die B-Zell-assoziierten Antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a) exprimieren, jedoch nicht CD5 und CD10. Eine Leichtkettenrestriktion mit starkem Übergewicht einer Klasse (kappa oder lambda), die im statistischen Normalfall in der B-Lymphozyten Population im Menschen im Verhältnis 1,5:1 ($\kappa:\lambda$) exprimiert werden, ist ebenfalls zu finden (15). Neben dem immunhistochemischen Nachweis der Leichtkettenrestriktion läßt sich, z.B. mittels PCR, in den meisten Fällen für den Antikörper auf der Zelloberfläche, ein klonales Rearrangement der Immunglobulingene nachweisen (3).

Im Gegensatz zu den Keimzentrumszell-Lymphomen des Lymphknotens zeigen die KKZL eher selten ein Rearrangement des bcl-2-Gens (4), dessen Genprodukt Zellen gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose) unempfindlich macht und eine ungehemmte Proliferation nach sich zieht (16). Grundlage der Fehlregulation ist bei den systemischen Lymphomen in der Regel eine Translokation t(14;18). Die Besonderheit ist, daß die Translokation t(14;18) bei primärer Hautmanifestation selten gefunden wird und einen Hinweis auf eine extrakutane Beteiligung geben kann (4). Aufgrund der günstigen Prognose ist die lokale Bestrahlung oder die Exzision Therapie der Wahl. Nur bei Disseminierung wird eine Chemotherapie in Betracht gezogen.

1.2.1.2 Kutanes Immunozytom/Marginalzonen-B-Zell-Lymphom

Charakteristisch für das primär kutane Immunozytom, mit ausgezeichneter Prognose (5 JÜR: 100%), ist eine Proliferation der kleinen Lymphozyten, lymphoplasmozytoiden Zellen und Plasmazellen (17). Bei dem sehr seltenen kutanen Lymphomtyp kann in Paraffinschnitten monotypisches Immunglobulin im Zytoplasma nachgewiesen werden. Klinisch sieht man einzeln oder multipel auftretende Knoten oder Plaques, vorrangig an den Extremitäten, dem Rumpf, der Lid- oder Orbitalregion lokalisiert (7). Das subkutane Fettgewebe wird oft mit infiltriert. Histologisch grenzen sich die knotigen oder diffusen Infiltrate gegen die Epidermis ab. Die monotypischen lymphoplasmozytoiden Zellen und Plasmazellen sind in den Randzonen des Infiltrates zu finden (17). Im Zentrum dagegen sind eine variable Anzahl reaktiver T-Zellen lokalisiert. Reaktive Follikelstrukturen sind nicht selten vorhanden. Einen diagnostischen Hinweis können sog. „*Dutcher bodies*“ (PAS-positive kugelige Einschlüsse im Kern) und

„Russel-Körperchen“ im Zytoplasma sein. Die immunhistochemische Phänotypisierung läßt die Zellen negativ für CD20, CD22, CD5 und CD10, hingegen positiv für den Marker CD79a erscheinen. Der Nachweis einer überexprimierten leichten Kette ist ein diagnostisch entscheidendes Kriterium (7). Lokal begrenzte Läsionen werden mit einer Radiotherapie behandelt oder exzidiert. Translokationen, die mit diesem Lymphomtyp in Verbindung stehen könnten, sind bisher nicht bekannt. Pathogenetisch wird eine chronische *Borrelia-burgdorferi*-Infektion mit diesem Tumor in Verbindung gebracht (18). Auch hier kann eine klonale Proliferation der Zellen und somit der Gene, die für die Immunglobuline im Zytoplasma kodieren, gefunden werden (19).

Das ebenfalls seltene Marginalzonen-B-Zell-Lymphom der Haut bildet mit dem Immunozytom eine gemeinsame Entität in der EORTC-Klassifikation. Abhängig von der Klassifikation und Betrachtungsweise wird der Tumor als SALT (*skin-associated lymphoid tissue*) (20) bzw. MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) (21) zugehörig oder als primäres Immunozytom (17) definiert. In einigen Veröffentlichungen wird diskutiert, daß die primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphome ebenfalls den Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen zuzuordnen sind (22;23). Die Annahme begründet sich u.a. auf der Erkenntnis, daß primär kutane B-Zell-Lymphome, wie auch die MALT-Lymphome, im Gegensatz zu den nodalen Keimzentrumszell-Lymphomen, die Antigene CD5 und CD10 nicht exprimieren und meist keine interchromosomale Translokation t(14;18) aufweisen.

1.2.2 Kutane B-Zell-Lymphome mit intermediärem klinischen Verlauf

1.2.2.1 Großzelliges kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität

Von der Pathogenese her betrachtet, handelt es sich bei dem insbesondere die untere Extremität befallenden Lymphomtyp, um ein Keimzentrumszell-Lymphom, das sich aber vor allem klinisch von den morphologisch ähnlichen späten primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphomen des Kopfes und des Rumpfes unterscheidet (12). Insbesondere die durchaus ungünstige Prognose (5 JÜR: 50%) rechtfertigt eine eigene Entität mit daraus folgender aggressiverer Therapie (Polychemotherapie). Histologisch dominieren Zentroblasten, Immunoblasten sowie große Zentrozyten das diffuse Infiltrat. Die Zellen sind CD19+, CD20+, CD22+ und CD79a+ und exprimieren im Gegensatz zu den KKZL des Kopfes und des Stammes das bcl-2 Protein (meist

ohne t(14;18)-Translokation) regelmäßig (24). Ein klonales Rearrangement der Immunglobulingene kann auch hier nachgewiesen werden. Bei einer Häufigkeit von ca. 10% sind bevorzugt ältere Frauen (Frauen/Männer: 3/1) betroffen.

1.2.3 Kutane B-Zell-Lymphome mit provisorischer Definition

1.2.3.1 Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom

Dieser äußerst seltene Lymphomtyp wird als eine Akkumulation und Proliferation von großen neoplastischen B-Zellen innerhalb von Blutgefäßen definiert und wird auch heute noch häufig als maligne Angioendotheliomatose diagnostiziert.

Die Prognose ist nach den bisherigen Erfahrungen eher ungünstig, eine genaue Charakterisierung steht aufgrund der geringen Prävalenz noch aus.

1.2.3.2 Kutanes Plasmozytom

Eine klonale Proliferation von Plasmazellen in der Haut ohne Manifestation eines multiplen Myeloms läßt auf die Diagnose eines primär kutanen Plasmozytoms schließen. Sie machen lediglich 4% der extramedullären Plasmozytome aus. Histologisch eindeutig zu erkennen sind die reifen und vielkernigen Plasmazellen ohne Durchmischung mit anderen klonalen Lymphozyten wie beim Immunozytom. Auch hier ist die exakte Klassifizierung aufgrund des seltenen Auftretens noch nicht abgeschlossen.

Die Gruppe der **Mantelzell-Lymphome** wird charakterisiert durch das Auftreten von kleinen B-Zellen, die das CD5 Antigen und das Cyclin D1 Protein exprimieren. Diese Entität wurde nicht in die neue Klassifikation aufgenommen, weil die Haut in der Regel sekundär befallen wird. Lediglich ein Fall von primärer Hautmanifestation wurde bisher beschrieben (25).

1.3 Struktur des Antikörpermoleküls und der Immunglobulingene

Antikörper (AK) sind antigenspezifische Produkte von B-Zellen. Sie bilden in ihrer Gesamtheit eine Familie von Plasmaproteinen, die sogenannten Immunglobuline. Ein Antikörpermolekül besitzt zwei klar unterscheidbare Funktionen. Dies ist zum einen die spezifische Erkennung des Antigens, zum anderen die Vermittlung von Wirkungs- und Effektormechanismen, die dieses Antigen unschädlich machen sollen. Die antigenbindende Region ist von AK zu AK sehr unterschiedlich, sie wird deshalb als variable Region (V-Region) bezeichnet. Die Region, die für die Vermittlung der Effektormechanismen des Immunsystems zuständig ist, wird konstante Region (C-Region) genannt. Die bemerkenswerte Vielfalt der Antikörpermoleküle ist die Folge eines hochspezialisierten Mechanismus und wird im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

Die typische Form eines Immunglobulins (Ig) ähnelt der eines "Y". Innerhalb der Gruppe der Immunglobuline unterscheidet man biochemisch und funktionell fünf Klassen von Antikörpern - IgM, IgG, IgD, IgA und IgE. Am Beispiel des IgG-Moleküls werden die allgemeinen strukturellen Merkmale in Abbildung 1 dargestellt.

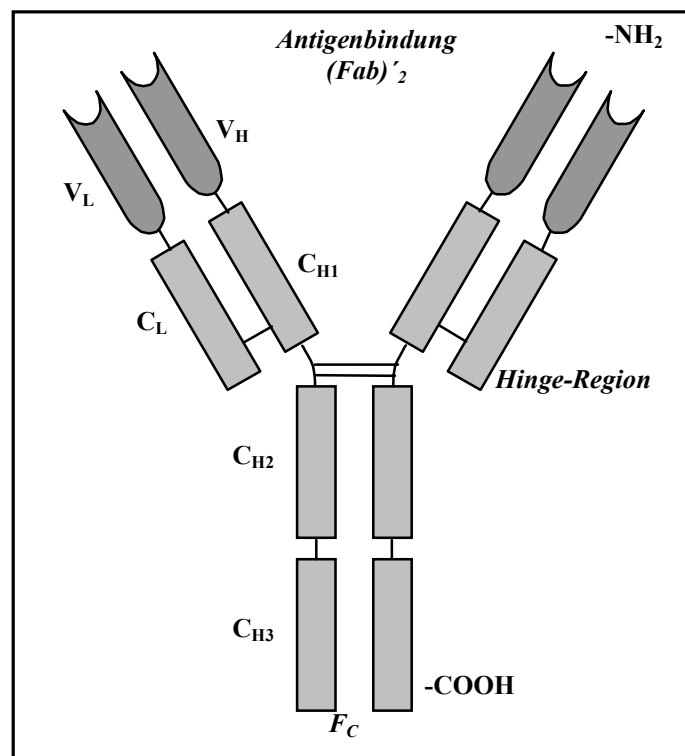


Abbildung 1: Struktur eines Antikörpermoleküls am Beispiel des IgG

Fab: antigenbindendes Fragment

Fc: *Fragment crystallizable*

(Fab)₂: bivalentes AG-bindendes Frag.

Die Struktur besteht aus insgesamt vier (2x2) Polypeptidketten. Die eine (mit etwa 50 kD) nennt man schwere (*heavy*) oder H-Kette, die andere (mit etwa 25 kD) leichte (*light*) oder L-Kette.

Zwei identische schwere Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken nahe der *Hinge-Region* miteinander und jede schwere Kette wiederum mit je einer leichten Kette verbunden.

Durch proteolytische Spaltung mit dem Enzym Papain nahe der beweglichen Gelenkregion (*Hinge-Region*) erhält man drei Fragmente. Zwei identische Fab-Fragmente mit antigenbindender Aktivität und ein Fc-Fragment mit Effektorfunktionen, wie z.B. Komplementfixierung oder Monozytenbindung.

Es existieren zwei Typen von leichten Ketten, die man als lambda- (λ -) bzw. kappa- (κ -) Ketten bezeichnet. Funktionelle Unterschiede zwischen Antikörpern, die Lambda bzw. Kappa exprimieren, konnten noch nicht gefunden werden. Das Verhältnis von κ zu λ variiert von Spezies zu Spezies und beträgt beim Menschen in etwa 1,5:1 (15;26). Ein Überschuss einer leichten Kette kann auf das Vorliegen eines B-Zell-Tumors hinweisen.

Die fünf Isotypen der schweren Ketten (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE) bestimmen mit der carboxyterminalen Hälfte (konstante Region - C_H-Region), die nicht mit der leichten Kette in Verbindung steht, die funktionelle Aktivität eines Antikörperproteins. Bei den Unterklassen IgD, IgG und IgA weisen die H-Ketten jeweils 3 C_H-Domänen, bei IgM und IgE 4 C_H-Domänen auf. Die L-Ketten besitzen lediglich eine konstante Domäne (C_L-Domäne). Diese liegen gegenüber der C_{H1}-Domäne.

Die aminoterminalen Regionen (variable Region - V-Regionen) der schweren als auch der leichten Ketten sind jeweils etwa 110 Aminosäuren lang und zeigen erhebliche Sequenzvariationen. Die V-Domänen eines H-L-Ketten-Paares bilden gemeinsam eine Antigenbindungsstelle und bestimmen den Idiotyp des Antikörpers. Die Sequenzvariabilität ist nicht gleichmäßig über die V-Regionen verteilt. Einige Abschnitte, die für die Struktur der V-Domänen verantwortlich zu sein scheinen, sind relativ gleichbleibend und werden als Gerüstregionen (*framework regions* -FR) bezeichnet. Die dazwischen liegenden Abschnitte mit weitaus höherer Variabilität nennt man hypervariable Schleifen (HV-Regionen) (27).

Es sind vier FR-Regionen (FR1, FR2, FR3, FR4) und drei HV-Regionen (HV1, HV2, HV3) zu unterscheiden. Die Sequenzvielfalt ist auch räumlich ganz bestimmten Bereichen der Oberfläche des Moleküls zugeordnet. Sie liegen jeweils am Rand des durch die Gerüstregionen gebildeten antiparallelen β -Faltblattes (Sekundärstruktur der Ig-Domänen). Da die hypervariablen Schleifen

die Bindungsstelle für Antigene bilden und die Spezifität durch eine Oberflächenstruktur festlegen, die zum Antigen komplementär ist, nennt man sie auch komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDR1, CDR2 und CDR3). Nach Kabat *et al.* (28) erstreckt sich der Bereich der CDR1 für die V_H-Gene von Position 31-35 und die CDR2 von Position 50-65. Der am meisten variable Teil der Domäne liegt in der CDR3 (27).

1.4 Vielfalt der humoralen Immunantwort - Antikörperdiversität

Die Vielfalt der Antikörper, die von reifen B-Zellen auf der Oberfläche exprimiert oder von Plasmazellen aktiv sezerniert werden, ist so groß, daß jede Zelle physiologischerweise einzigartig ist. Es sei denn, sie gehört zu einem Klon, z.B. im Rahmen einer malignen Entartung. Die Antwort auf ein einfaches Antigen ist vielfältig und umfaßt viele unterschiedliche Antikörpermoleküle, von denen jedes eine eigene Affinität und Spezifität besitzt. Wie kommt nun diese Vielfalt zustande?

Die variablen Regionen der Immunglobulinketten werden durch Rekombination verschiedener Gensegmente gebildet. Diese DNA-Sequenzen sind in der Keimbahn-DNA weit voneinander entfernt. In den Lymphozyten der B-Zelllinie werden die Segmente der genomischen DNA umgelagert, man spricht hier von **somatischer Rekombination**. Die V-Region der schweren Kette wird durch drei verschiedene DNA-Abschnitte kodiert. Ein den größten Teil bildendes V_H-Gensegment (95-101 AS) wird durch DNA-Umlagerungen mit einem D-Gensegment (*diversity*) und einem J_H-Gensegment (*joining*) rekombiniert. Die VDJ-Verknüpfung führt zu einem durchgehenden DNA-Segment, das die gesamte variable Domäne der schweren Kette kodiert. Bei der leichten Kette besteht das DNA-Stück nur aus einer V-J-Rekombination, D-Segmente fehlen vollständig (29).

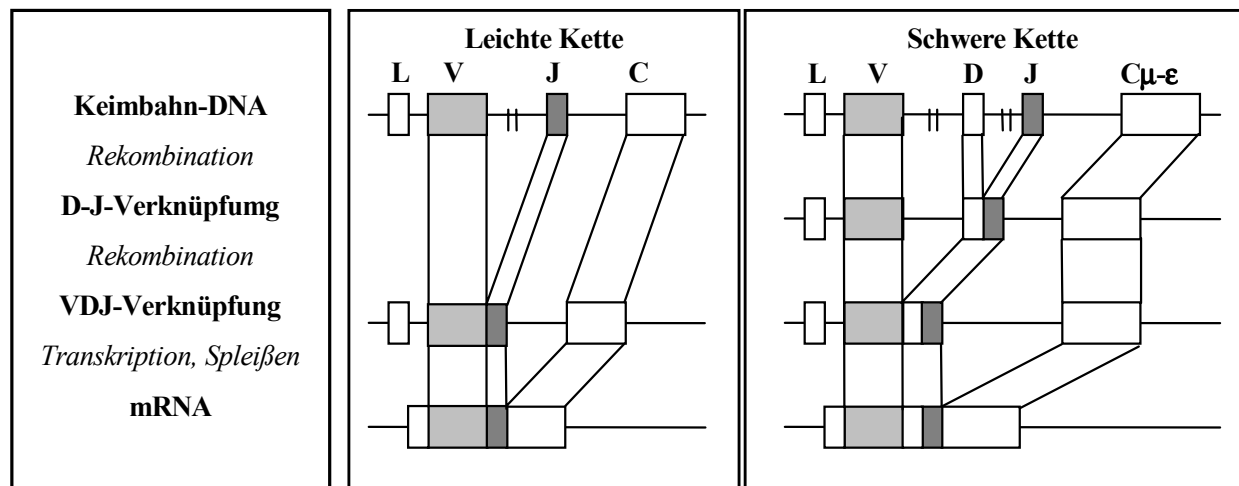


Abbildung 2: V(D)J-Rekombination der Gene für den variablen Teil der schweren und der leichten Kette; vor dem V-Gen-Segment liegt ein Exon, das ein *leader*-Peptid (L) kodiert; es schleust das Protein in das endoplasmatische Retikulum (ER) ein und wird anschließend abgeschnitten, dies ist für die spätere Sezernierung entscheidend.

Es sind im wesentlichen vier Mechanismen, die zur Unverwechselbarkeit eines Immunglobulins führen (30). Drei davon sind Folgen der somatischen Rekombination, die der Herstellung der vollständigen variablen Genbereiche dient. Der vierte ist ein Mutationsprozeß, der nur auf umgelagerte DNA einwirkt.

Die verschiedenen Gensegmente, welche zusammen die variablen Domänen kodieren, liegen in der Keimbahn-DNA in multiplen Kopien vor (Tabelle 2), die einen gewissen Grad an Heterogenität aufweisen. Während der meiotischen Rekombination kann es zu Insertion oder Deletion von Gensegmenten kommen, oder ein funktionstüchtiges Gen kann durch Mutationen in ein Pseudogen umgewandelt werden. Aufgrund dieses genetischen Polymorphismus stimmen die Zahlen nicht bei allen Menschen überein.

Tabelle 2: Anzahl der funktionellen Gensegmente für die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten in menschlicher DNA (31)

Segment	Leichte Ketten		Schwere Kette
	κ	λ	H
V-Segmente	40	29	51
D-Segmente	0	0	27
J-Segmente	5	4	6

Allein durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der funktionellen Genabschnitte entsteht ein beträchtlicher Teil der Vielfalt. Die funktionellen Genloci liegen für die λ -Gene auf Chromosom 22, für die κ -Gene auf Chromosom 2. Den Locus für die schwere Kette findet man auf Chromosom 14. Sowohl die Gen-Segmente der schweren Kette als auch die der κ -Ketten kann man in sechs Familien unterteilen. Die Mitglieder einer Familie stimmen zu wenigstens 80% in ihrer Nukleotidsequenz überein. Demgegenüber lassen sich die $V\lambda$ -Gensegmente in acht Familien einteilen.

Ein zweiter Grund für die Diversität der Immunglobulingene ist die Tatsache, daß sich die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette ebenfalls verschieden kombinieren können. Diese Fähigkeit, durch Zusammenstellung einer relativ geringen Zahl von Segmenten viele verschiedene Spezifitäten zu erzeugen, nennt man auch **kombinatorische Vielfalt** (31).

Der dritte Mechanismus zur Diversifizierung des Antikörperrepertoires ist die ungenaue Verknüpfung der V-, (D-) und J-Segmente und das Einfügen von matrizenunabhängigen Nukleotiden. Während des Aneinanderfügens sind Exonukleasen aktiv, die von den einzelnen Bausteinen die Enden abspalten können. Zwei der drei hypervariablen Schleifen liegen innerhalb des V-Segmentes. Die dritte Schleife liegt in der Verknüpfungsstelle zwischen dem V- und dem J-Segment (leichte Kette) und wird bei der schweren Kette teilweise vom D-Segment kodiert. In dieser sogenannten CDR3 erhöht sich die Vielfalt durch die Deletion und das Hinzufügen von P- bzw. N-Nukleotiden. P-Nukleotide umfassen palindrome (P) Sequenzen, die an den Enden der Gensegmente während der Rekombination durch die Aktivität von Endonukleasen entstehen.

Bis zu 20 N-Nukleotide, die *nicht* in der DNA-Matrize kodiert sind, werden durch ein Enzym, die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT), in die kodierende DNA eingefügt (32). Dieser Effekt wird als **junktionale Vielfalt** bezeichnet und kann nur unter Inkaufnahme von Verlusten in Form von nicht lesbaren Pseudogenen („stop-Codon“, „Frame-shift“) erfolgen. Durch die zufällige Anzahl der eingefügten N-Nukleotide verschiebt sich das Leseraster der nachfolgenden Sequenz. Derartige Rasterverschiebungen führen häufig zu einem nicht-funktionellen Protein. Zwei von drei Umlagerungen sind nicht produktiv.

Die **somatische Hypermutation** bewirkt letztendlich eine weitere Diversifizierung der variablen Genabschnitte der Immunglobuline. Dieser Prozeß, der auch als Affinitätsreifung bezeichnet werden kann, findet nicht, wie die drei erst genannten, in den primär lymphatischen Organen, sondern *antigenabhängig* in den Keimzentren der sekundär lymphatischen Organe statt. Es werden nach dem Kontakt einer naiven B-Zelle (s.u.) mit dem Antigen in den variablen

Regionen der rearrangierten Gene in unterschiedlichem Umfang Punktmutationen eingefügt, so daß veränderte Immunglobuline an der Oberfläche von B-Zellen erscheinen. Diejenigen mit der höchsten Affinität für das Antigen werden selektiert. Die somatische Hypermutation erreicht eine Mutationsrate von einem Basenpaar pro 10^3 pro Zellteilung und geschieht in den sich teilenden Zentroblasten.

Da in einer B-Zelle ungefähr 360 Basenpaare jedes der exprimierten Gene der variablen Region der schweren und leichten Kette kodieren und ungefähr drei von vier Basenaustauschvorgängen zu einer veränderten Aminosäure führen, erhält bei jeder Teilung jede zweite Zelle in ihrem Antigen-Rezeptor eine Mutation. Punktmutationen, die zu keiner veränderten Aminosäuresequenz führen, nennt man stille oder stumme Mutationen, sie verteilen sich zufällig über die gesamte V-Gen-Region. Durch die Selektion auf verstärkte Antigenbindung werden vornehmlich in den CDR-DNA-Regionen produktive Austauschmutationen beobachtet, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen (33).

Nukleotidaustausch findet jedoch auch in rearrangierten Genen der variablen Regionen statt, die nicht produktiv sind und nicht exprimiert werden können. Hier geschieht also Mutation, ohne Selektion auf verstärkte Antigenbindung. Das Verteilungsmuster der Mutationen ist auch hier nicht rein zufällig, sondern in sogenannten „hotspots“, die auf die Bevorzugung kurzer Motive von vier oder fünf Nukleotiden hindeuten, konzentriert (34).

1.5 Die Entwicklung der B-Lymphozyten/Lymphopoese der B-Zellen

Der Begriff B-Lymphozyt wurde ursprünglich von *Bursa Fabricii* abgeleitet, einem lymphatischen Organ der Vögel, in dem B-Zellen gebildet werden und heranreifen. Der Mensch verfügt über kein entsprechendes Organ, bei ihm ist die Geburtsstätte der B-Lymphozyten das Knochenmark (*bone marrow*). Allerdings beginnt die physiologische Lymphopoese schon in der frühen Schwangerschaft in der fetalen Leber und wird erst nach der Geburt vollständig vom Knochenmark übernommen. Aus einer lymphopoetischen multipotenten Stammzelle entwickeln sich unter dem Einfluß verschiedenster Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sogenannte Vorläufer-B-Zellen, aus denen letztendlich reife B-Lymphozyten entstehen, die auf der Oberfläche ein intaktes Immunglobulin mit einer einzigartigen Spezifität präsentieren. Jedes Entwicklungsstadium der B-Zelle zeichnet sich durch spezifische Oberflächenmoleküle (CD = *cluster of differentiation*) und durch ein genau definiertes Stadium der Rekombination ihrer Immunglobulingene für die leichte und schwere Kette aus (29). Auch Subpopulationen können

anhand der Oberflächenmarker (CD) unterschieden werden (z.B. CD5+/CD5-) (35). Die Erkenntnisse aus der B-Zell-Ontogenese lassen Rückschlüsse auf die Ursprungszelle einer malignen Entartung und auf die Ätiologie zu.

Tabelle 3 faßt die B-Zell-Entwicklung schematisch zusammen und beinhaltet die wichtigsten Differenzierungsmerkmale.

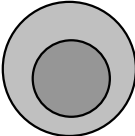
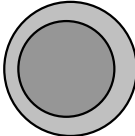
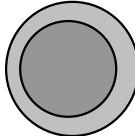
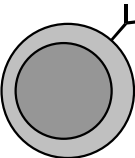
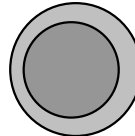
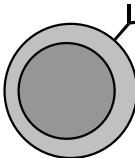
	Stamm-Zelle	Frühe Pro-B-Zelle	Späte Pro-B-Zelle	Große Prä-B-Zelle	Kleine Prä-B-Zelle	Unreife B-Zelle
						
H-Ketten-Gene	Keimbahn	D-J-Umordnung	V-D-J-Umordnung	VDJ umgeordnet	VDJ umgeordnet	VDJ umgeordnet
L-Ketten-Gene	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	V-J-Umordnung	VJ umgeordnet
Oberflächen-Ig	fehlt	fehlt	fehlt	μ-H-Kette Prä-B-Rezeptor	μ-Kette im Zytoplasma	IgM
Marker-Protein	CD34	CD34 CD10;19	CD40 CD10;19;20	CD40 CD19;20	CD40 CD19;20	CD40 CD19;20
Intrazelluläre Proteine		RAG-1,-2 TdT λ5,VpreB	TdT λ5,VpreB	RAG-1,-2 μ λ5,VpreB	μ	

Tabelle 3: Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark nach Rolink *et al.* (36); Erläuterung der Abkürzungen im Text

1.5.1 Stadien der B-Zell-Entwicklung

Die Stadien sind durch schrittweise Umordnung und Expression der Immunglobulingene der schweren (H-) und der leichten (L-) Ketten definiert.

Die frühesten Zellen der B-Zellinie nennt man Pro-B-Zellen. Diese Vorläuferzellen können sich nur begrenzt erneuern. In den frühen Pro-B-Zellen erfolgt die Verknüpfung der D_H-J_H Segmente, in der späten Pro-B-Zelle die vollständige Rekombination des VDJ-Abschnittes für die schwere Kette. Voraussetzung ist die Aktivität der rekombinationsaktivierenden Gene (RAG-1, RAG-2)

sowie der TdT, die in diesem Stadium intrazellulär exprimiert werden. Die Produkte von RAG-1 und -2 sind spezialisierte Endonucleasen und leiten den ersten Spaltungsschritt der DNA ein. Folge der erfolgreichen Verknüpfung ist die Expression einer intakten μ -H-Kette. Zusammen mit einer Ersatz-L-Kette (*surrogate light chain* - SLC), kodiert durch die Gene VpreB und $\lambda 5$, wird der Prä-B-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche sichtbar. Er ist das Kennzeichen der nächsten Entwicklungsstufe, der Prä-B-Zelle (35). Das Erscheinen des Prä-B-Rezeptor-Komplexes ist ein wichtiger Kontrollpunkt in der B-Zell-Entwicklung. Die großen Prä-B-Zellen werden zur Proliferation angeregt und teilen sich aktiv. Aus diesem Stadium entwickeln sich kleine Prä-B-Zellen, in denen es zur Umlagerung der V-J Segmente für die leichte Kette kommt. Mit Abschluß der Umordnung kann ein komplettes IgM-Molekül auf der Oberfläche präsentiert werden. Die Zelle wird nun als unreife B-Zelle bezeichnet.

Alle bisher beschriebenen Stadien der Entwicklung finden antigenunabhängig im Knochenmark statt. Die überlebenden B-Zellen begeben sich in die Peripherie und differenzieren zu reifen B-Zellen, die außer IgM auch IgD exprimieren und, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen, naive B-Zellen genannt werden. Spezifische Marker der frühen B-Zell-Entwicklung sind Oberflächenmoleküle (CD). Für die Erforschung der Ätiologie lymphoproliferativer Erkrankungen sind sie von Nutzen, um evtl. Rückschlüsse auf den Entartungszeitpunkt machen zu können.

T-Zell- und antigenabhängig kommt es zur erneuten Aktivierung und Proliferation in den sekundär lymphatischen Organen. Beim Eintritt aktivierter B-Zellen in die primär lymphatischen Follikel beginnen sie mit der Teilung und bilden Keimzentren aus. Dort vollzieht sich anschließend die oben beschriebene Affinitätsreifung. Welche Entwicklungsrichtung die reife B-Zelle nimmt, hängt vermutlich von der Interaktion des CD40-Antigens der B-Lymphozyten mit dem entsprechenden Liganden der T-Helfer-Zellen ab. Die Bindung an CD40 scheint verantwortlich für die Ausdifferenzierung von B-Gedächtniszellen und den Isotypenwechsel zu sein (37).

1.6 Merkmale maligner B-Zellproliferationen/Klonalität

B-Zell-Tumoren repräsentieren die klonale Expansion einer einzigen malignen transformierten Zelle, die nahezu aus jedem Entwicklungsstadium der B-Lymphozyten hervorgehen kann. Sie bewahren viele Charakteristika der Zelle, aus der sie hervorgegangen sind, z.B. die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle oder die Möglichkeit zur somatischen Hypermutation. Alle

Zellen eines Tumors weisen die gleichen Rekombinationen von Immunglobulingenen auf, was die Abstammung von einer gemeinsamen Vorläuferzelle dokumentiert. Die nachweisbar identische Immunglobulingenumlagerung, insbesondere der identische hochvariable CDR3-Abschnitt, sowie deren Analyse ist von großem Wert für die Erforschung und Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen (38).

1.7 Techniken zum Klonalitätsnachweis

Lange Zeit wurden zur Diagnosestellung von kutanen lymphoidzelligen Infiltraten lediglich morphologische und immunhistochemische Merkmale herangezogen (9;39). Die typisch histologischen Merkmale für Malignität und die immunphenotypische Leichtkettenrestriktion mit Überexpression einer leichten Kette (κ oder λ) (40) geben Hinweise auf eine maligne Entartung. Die klonale Expansion einer B-Zellpopulation, als entscheidendes Merkmal für die Malignität eines Infiltrates, kann weder anhand von Histologie noch mittels Immunhistochemie bewiesen werden.

Eine unterschiedliche VDJ-Verknüpfung in der Nukleotidsequenz von Immunglobulingenen, d.h. die Verwendung von verschiedenen V-, D- und J-Genen für die Rekombination sowie eine uneinheitliche CDR3-Region identifizieren die Herkunft von unterschiedlichen Vorläuferzellen in einer B-Zellpopulation. Man spricht von **interklonaler** Divergenz oder Polyklonalität. Hingegen werden in Lymphozytenpopulationen eine *gleiche* CDR3-Region und *gemeinsam* auftretende Mutationen in den Nukleotidsequenzen von Immunglobulingenen genutzt, um einen klonalen Ursprung, aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, festzustellen. Sind innerhalb des Klones Sequenzen vorhanden, die neben den gemeinsamen, im speziellen im CDR3-Bereich, weitere Nukleotidunterschiede in der Gensequenz aufweisen, spricht man von **intraklonaler** Divergenz (41).

In den letzten 2 Jahrzehnten sind einige erfolgreiche Techniken etabliert worden, um normale und transformierte Lymphozyten zu studieren. Die Southern-Blot-Hybridisierung (SBH) erweist sich für den Nachweis von rearrangierten Immunglobulingenen als akkurate und reproduzierbare Methode. Die Anwendung der SBH bei der Untersuchung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) konnte die Zelllinie, aus der die Tumorzellen abstammen, identifizieren und die klonale Natur beweisen (42). Jedoch verlangt diese Methode eine relativ reine Population von Zellen und benötigt eine beträchtliche Menge (30-50 μ g) gut erhaltener DNA. So beschränkt sich der Einsatz der Methode vor allem auf Zelllinien, Hybridome oder frische Biopsieproben, in denen

eine homogene Population dominiert. Stellt die zu untersuchende, tumorspezifische DNA (klonale Zellpopulation) einen geringeren Anteil als 3-5% dar, gerät die SBH an ihre Sensitivitätsgrenze. Daraus resultiert eine falsch-negative Rate von 4-5% (43). Die „in situ“ Hybridisierung ist eine Technik mit dem Vorteil, die Genexpression im histologischen Kontext zu visualisieren. Die Sensitivität konnte durch Kombination mit der PCR-Technik („in situ“ PCR) erheblich erhöht werden.

Verschiedene Methoden, die auf der PCR-Technik basieren, identifizieren klonale B-Zellpopulationen aus DNA, die aus Gewebeschnitten oder dem peripheren Blut isoliert wurde (Populationsanalysen). Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hat gegenüber der SBH den Vorteil, wesentlich weniger Anforderungen an die Qualität als auch die Quantität der zu untersuchenden DNA zu stellen. Das Verfahren, welches mit relativ geringem zeitlichen Aufwand das dominante Gen-Rearrangement herausfinden kann, benötigt zum Klonalitätsnachweis ebenfalls einen relativ großen Anteil an Tumor-DNA (mindestens 1,5% an der Gesamt-DNA). Ist diese Voraussetzung nicht erfüllt, können die polyklonalen Amplifikationsprodukte die Produkte der klonalen Population überschatten.

Die PCR-Technik ist nicht nur nützlich, um klonale Zellen zu erkennen, sondern kann auch verwendet werden, um zusätzliche Charakteristika von malignen B-Zellklonen aufzuzeigen. Sequenzanalysen der PCR-Produkte können neben der Identifikation des klonalen Immunglobulinen-Rearrangements auch somatische Mutationen aufzeigen. Der Stellenwert von Mutationsanalysen ist von besonders großem Interesse seit bekannt ist, daß aus dem Differenzierungsstadium der Tumorzellen Rückschlüsse auf die Ursprungszelle gezogen werden können (44).

Für die Interpretation von Punktmutationen in den variablen Abschnitte kodierenden Genen ist eine Methode notwendig, die die Nukleotidsequenzen mit hoher Zuverlässigkeit darstellt. Den erwähnten Verfahren ist gemeinsam, daß die DNA aus Zellpopulationen extrahiert wird. Ein Artefakt der PCR Amplifikation von Ig-Genen aus einer Zellgruppe ist die Formation von hybriden (chimären) Molekülen. Diese können erzeugt werden, wenn sehr ähnliche DNA-Sequenzen (wie z.B. rearrangierte Ig-Gene) in ein und demselben Reaktionsgefäß amplifiziert werden. Die hybriden Moleküle entstehen hierbei durch artifizielle Rekombination von homologen Gensegmenten aus Rearrangements verschiedener B-Zellen während des Amplifikationsprozesses. Hierbei kann es zur Hybridbildung bzw. Zusammenlagerung zwischen unterschiedlichen oder gleichen die V-Region kodierenden Genen bzw. deren Mutationsvarianten kommen, in Abhängigkeit von den in den jeweiligen Zellen rearrangierten

Keimbahngenen. Da die Identifikation der verfälschten Nukleotidsequenz des Amplifikates nicht immer möglich ist und eine Veränderung der Mutationsverteilung ergeben kann, verhindern die hybriden Moleküle die zuverlässige Interpretation solcher Experimente (41). Wenn oligo- oder polyklonale Lymphozytenpopulationen analysiert werden, müssen sie vor der Sequenzierung in Plasmide kloniert werden. Der Einbau falscher Nukleotide durch die Taq-DNA-Polymerase erweist sich als erheblicher Nachteil zur Interpretation von somatischen Mutationen oder gar intraklonaler Diversität (52).

Durch Analysen auf Einzelzellniveau lassen sich die eben erwähnten Nachteile minimieren (45). Das PCR-Produkt, das man von einer einzelnen Zelle erhält, repräsentiert ein individuelles Rearrangement und kann direkt sequenziert werden. Für die Identifikation von Punktmutationen sind hier die Sequenzartefakte der Taq-Polymerase zu vernachlässigen.

Bei diesem Verfahren wird die Mikromanipulation einer Einzelzelle aus einem histologischen Gewebeverband kombiniert mit einer PCR-Amplifikation des variablen Ig-Abschnittes in dieser Zelle. Spezielle Fragestellungen lassen sich nur mit der Einzel-Zell-Technik untersuchen. So ist es möglich, in einer Zelle verschiedene Gene parallel zu amplifizieren, z.B. die gemeinsame Analyse der Gene für die schwere und die leichte Kette, um die B-Zell-Entwicklung weiter zu erforschen. Der Differenzierungsprozeß von B-Zellen kann außerdem in Abhängigkeit von der speziellen Umgebung des sekundär lymphatischen Gewebes examiniert werden. Und es besteht die Möglichkeit, durch Zuordnung von rearrangierten V-Gen-Sequenzen zu individuellen Zellen, den Umfang klonaler Proliferationen zu studieren und intraklonale Diversität in Abhängigkeit von der Lokalisation im Gewebeverband festzustellen (45).

Ein weiterer Einsatzbereich der Technik ist die Möglichkeit, Zellen zu studieren, die mit den konventionellen Methoden schwer zu isolieren sind. Für Reed-Sternberg Zellen beim Morbus Hodgkin, die häufig weniger als 1% der Zellen des Tumors ausmachen (46), konnte so der Klonalitätsnachweis und der Nachweis der B-Zell-Abstammung erbracht werden (47). Diese Methode kann ebenfalls als diagnostisches Werkzeug bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen eingesetzt werden, um nach der Therapie kleinste Residuen zu identifizieren und die Therapieeffizienz zu beobachten.

Die Einzel-Zell-PCR von rearrangierten Immunglobulingenen aus mikromanipulierten B-Zellen erlaubt es, die B-Zell-Differenzierung im histologischen Kontext zu untersuchen und durch den evtl. Nachweis somatischer Hypermutation sowie andauernder Mutationen, Entwicklungsstadium und Ursprungszelle eines Tumors zu analysieren.

2 Aufgabenstellung

Die Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Durch die Einführung moderner molekularbiologischer Techniken konnte ein großer Erkenntniszuwachs gewonnen werden, der auch das Verständnis für die Ursachen der Entstehung von primär kutanen B-Zell-Lymphomen verbessert hat.

Mit Hilfe der Einzel-Zell-PCR-Technik konnte diese Krankheitsgruppe molekularbiologisch als vergleichbar mit den systemischen Non-Hodgkin-Lymphomen vom B-Zell-Typ charakterisiert werden.

Ein wichtiges Kriterium für die Klassifikation von B-Zell-Lymphomen ist das Vorhandensein von klonaler Diversität. Sie kommt in einem von klonaler Zelle zu klonaler Zelle leicht unterschiedlichen Mutationsmuster der variablen Immunglobulin-Genabschnitte zum Ausdruck.

Die klonale Diversität spricht für einen andauernden Prozeß einer antigengetriebenen Selektion und ist für Keimzentrumszell-Lymphome charakteristisch. Dieses Phänomen fehlt bei „Vor-Keimzentrumszell-Lymphomen“ (*pre-germinal center cell lymphomas*) häufig. So exprimieren B-Zellen bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) die variablen Genabschnitte der Immunglobulingene in unmutierter, keimbahnidentischer Form (48). Hingegen spricht man von *post-germinal center cell lymphomas*, wenn die Ig-Gene des Tumorklons mutiert sind, jedoch das Mutationsmuster konstant bleibt.

Das Verfahren der Einzel-Zell-PCR vermag über die klonale Diversität einer malignen B-Zellpopulation weitaus mehr Auskunft zu geben, als z.B. Genbanken und Klonierungstechniken. Die zu analysierenden Einzelzellen werden normalerweise lediglich aus sehr begrenzten Abschnitten, zumeist einer einzigen Biopsie, gewonnen.

Dies läßt die Tatsache außer Acht, daß an einer Stelle des soliden Tumors klonal divergierende Zellen zu finden sein könnten, an anderer jedoch nicht.

Die Untersuchung eines sehr begrenzten Tumoreals kann zur Folge haben, daß unterschiedliche Subklone unentdeckt bleiben und somit der Entwicklungsstand des Tumors versuchstechnisch bedingt als „Nach“-Keimzentrumszell-Lymphom (*post-germinal center cell lymphoma*) bezeichnet wird. Ist aber in einem anderen Ausschnitt des Tumors andauernde Mutation zu beobachten, kann es sich molekularbiologisch ebenfalls um ein Keimzentrumszell-

Lymphom (*germinal center cell lymphoma*) handeln, in dem die entarteten B-Zellen, wie ihre physiologischen Äquivalente, noch an der Keimzentrumsreaktion beteiligt sind und dem Prozeß der somatischen Hypermutation unterliegen.

Wir stellen uns deshalb die Aufgabe der Evaluierung der Einzelzellanalyse von kutanen B-Zell-Lymphomen hinsichtlich der Aussage „Klonale Diversität“?

Die Fragestellung wurde bearbeitet, indem

- 1) aus verschiedenen, deutlich voneinander getrennten Arealen des Tumorknotens zweier Patienten mit kutanen B-Zell-Lymphomen Biopsien gewonnen wurden,
- 2) aus diesen Biopsien jeweils eine repräsentative Anzahl einzelner Lymphomzellen durch Mikromanipulation isoliert wurde und
- 3) in diesen mittels Einzel-Zell-PCR und Sequenziertechnik die Nukleotidsequenzen der variablen Immunglobulin-Genabschnitte analysiert wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenauswahl

Zwei Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité Berlin mit kutanen B-Zell-Lymphomen wurden mittels molekularbiologischer Methoden untersucht. Das zu untersuchende Tumormaterial wurde durch räumlich getrennt entnommene Stanzbiopsien gewonnen. Von Patient WS wurden drei, von Patient LB acht Biopate aus dem jeweiligen Exzizat eines Lymphomknotens analysiert.

3.1.1 Patient WS

Der damals 84 Jahre alte Patient befand sich im Frühjahr (Januar-März) 1997 in stationärer Behandlung der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité. Seit einem Jahr fiel eine größenprogrediente, knotige Effloreszenz ohne Juckreiz am linken Hinterkopf auf. Der occipital-parietal gelegene Knoten manifestierte sich zu diesem Zeitpunkt mit einem Durchmesser von 8 cm. Das makroskopische Erscheinungsbild zeigte eine erythematöse und zerklüftete Oberfläche mit zentralen Ulcerationen sowie einer ansonsten atrophischen Epidermis. An der linken Halsseite war zudem ein ca. 1 cm auf der Unterlage verschieblicher Knoten tastbar.

Der Tumor wurde nach einer Stanzbiopsie vollständig exzidiert und mit Vollhaut gedeckt. Die histologische Untersuchung ergab ein diffus konfluierendes, vom oberen Korium beginnendes, bis tief in die Subkutis reichendes, lymphoidzelliges Infiltrat, welches neben kleinen bis mittelgroßen kompakten lymphozytären Zellen, herdförmig betont, größere, blassere Zellelemente mit unregelmäßigem Kernchromatin beinhaltete, die zytomorphologisch an Zentrozyten, Zentroblasten und teilweise an Immunoblasten erinnerten. Lymphoplasmozytoide Zellen konnten in nicht unerheblicher Menge abgegrenzt werden (Abbildung 3, 4 und 5).

Immunhistochemisch wurde die Hauptmenge der Infiltratzellen als B-Lymphozyten identifiziert (CD20 positive Lymphozyten). Neben der Betonung der B-Zellen wurde im Randbereich des Tumors ein umschriebener T-Zellanteil ausgemacht. Die Proliferationsrate betrug 10% bei diffuser Verteilung im Infiltrat. An zwei Stellen konnten stark proliferierende Keimzentren gefunden werden (hier Proliferationsrate größer als 40%), die auf eine Korrelation mit einer B-Zell-Population hinweisen.

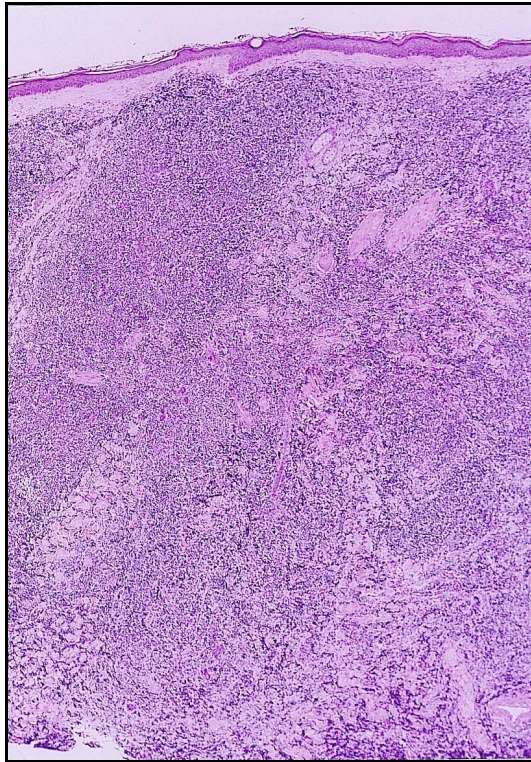


Abbildung 3: histologisches Präparat der Stanzbiopsie des KKZL vom Patienten WS in HE-Färbung; 10fach vergrößert

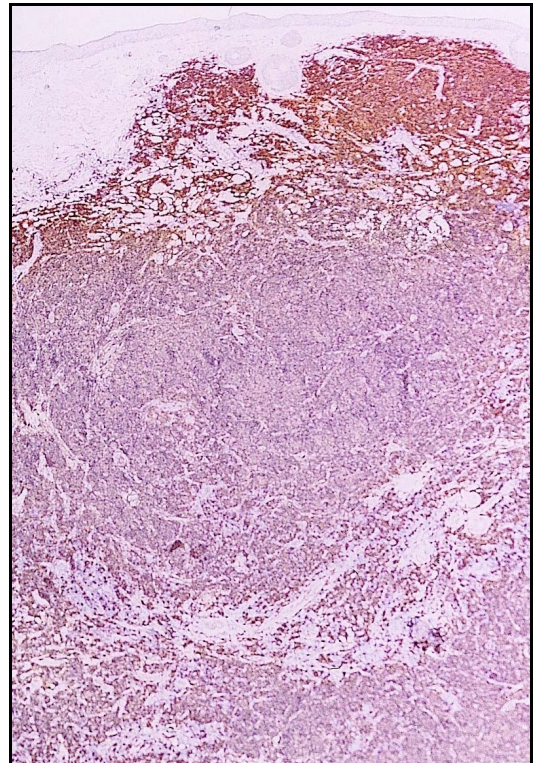


Abbildung 4: histologische Übersicht des Exzisates; CD20 gefärbt und ebenfalls 10fach vergrößert

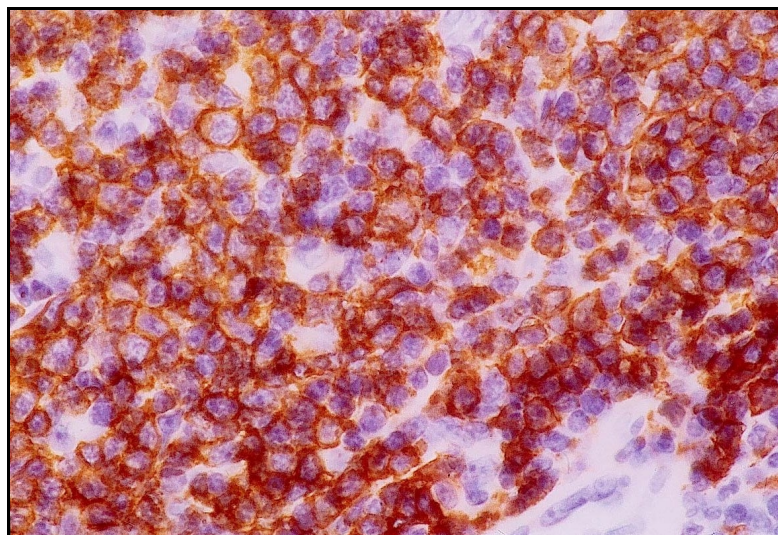


Abbildung 5: CD20-angefärbte B-Zellen wie in Abbildung 4 in 160facher Vergrößerung

In geringer Menge und gleichmäßiger Verteilung waren CD68 positive Makrophagen eingestreut.

Die routinemäßig durchgeführte molekularbiologische Diagnostik zeigte in der Thermogradientengelelektrophorese (TGGE) der PCR-Produkte für die gamma-Kette des T-Zell- Rezeptors (TCR γ -Rezeptor) polyklonale, für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH-Kette) kein Amplifikat. In einem umschriebenen Areal (lymphoplasmozytoide Zellen) fand sich eine Leichtkettenrestriktion mit Überexpression der leichten Kette kappa. Der gesamte Tumor, d.h. alle T- und B-Zellareale, stellte sich bcl-2 positiv dar. Die histologische und immunhistochemische Untersuchung führte zu der Diagnose eines primär kutanen Keimzentrumszell-Lymphoms (B-Zell-Lymphom vom Keimzentrumszelltyp).

Molekularbiologisch gelang der Nachweis einer klonalen B-Zell-Expansion für die schwere Kette nicht. Der weitere körperliche Status wurde anhand von umfassenden Untersuchungen erhoben. Blutparameter, Röntgenaufnahme des Thorax und Sonographie des Abdomens ergaben keinen Hinweis auf eine extrakutane Beteiligung. Bei weiterführender bildgebender Diagnostik (CT von Abdomen und Becken, Halsbereich) wurden verdächtige Areale in der Leber sowie Lymphknotenmanifestationen links iliakal, links inguinal und interaortokaval erkennbar. Eine Weichteilsonographie von Haut und Subkutis im linken Halsbereich ergab ein 12x9x17 mm großes echoarmes Areal mit typisch echoreichem Randwall. Die eventuell auf eine Absiedlung hinweisenden Befunde waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor ca. einem Jahr nicht beschrieben. Der Patient lehnte eine weiterführende Diagnostik ab, daher konnten die Befunde nicht eindeutig geklärt werden.

3.1.2 Patient LB

Im August 1995 bemerkte der 54 jährige Patient LB einen stark juckenden Knoten am Rücken im Bereich der linken Schulter. Nach einer Probebiopsie und Ausschluß einer extrakutanen Beteiligung wurde die Diagnose eines kutanen B-Zell-Lymphoms vom Keimzentrumszelltyp gestellt. Nach einer erfolgten Strahlentherapie (40 Gy Summendosis) kam es zur Rückbildung, jedoch manifestierten sich Neubildungen jenseits des Bestrahlungsfeldes, woraufhin die Strahlentherapie Anfang 1996 fortgesetzt wurde.

Ende 1996 bildeten sich im Schulter- und Rückenbereich (subscapulär) erneut zwei subkutane Knoten.

Die in der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité entnommene Probeexzision ergab folgende Befunde. In den Gewebeproben zeigte sich histologisch (Abbildung 6, 7 und 8) ein von der Epidermis abgesetztes großknotig bis diffus konfluierendes, das gesamte Korium und die angrenzende Subkutis infiltrierendes lymphohistiozytäres Zellkonglomerat. Zytomorphologisch waren die blassen Zellen mit wechselndem Kernchromatin größtenteils den Zentroblasten und teilweise den Zentrozyten zuzuordnen. Bei der immunhistochemischen Untersuchung stellten sich die großen konfluierenden Zellen als CD20 und CD79a-positive B-Zellen dar, die eine Proliferationsrate von nahezu 100% aufwiesen. Die Tumorzellen sind bcl-2 negativ, eine Expression der leichten Ketten lambda und kappa konnte hier nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde eine Follikelbildung ausgeschlossen, da die Markierung der follikulären dendritischen Zellen (FDC) negativ war. In der Biopsie konnte molekularbiologisch für die γ -Kette des T-Zell-Rezeptors ein polyklonales, für die schwere Kette des Immunglobulins ein monoklonales Amplifikationsprodukt gefunden werden.

Im Januar 1997 wurde ein erneutes Staging durchgeführt. Der mittlerweile 6x6 cm umfassende Tumor am linken Schulterblatt mit unscharf begrenztem Umgebungserythem wurde vollständig operativ entfernt. Histologisch glich der Befund der Probebiopsie. Immunhistochemisch wurde festgestellt, daß die atypischen Zellen die leichte Kette lambda exprimierten. Im Gegensatz zur Voruntersuchung fand sich jetzt eine Leicht-Kettenrestriktion mit Fehlen der kappa-Kette und Überexpression der lambda-Kette. Differentialdiagnostisch kommt ein Keimzentrumszell-Lymphom oder Marginalzonen-Lymphom in Frage.

Die extern durchgeführte Knochenmarkbiopsie zeigte keinen Anhalt für Malignität, auch die weitere bildgebende Diagnostik (CT-Thorax, -Abdomen, -Becken, sowie Sonographie-Abdomen, -Lymphknoten und -Schilddrüse) zeigte keine lymphomverdächtigen Strukturen.

Ein halbes Jahr später traten erneut erythematöse Knoten auf. Eine IL-2/INF α 2a-Therapie (9 ME s.c., IL Mo.-Fr; INF Mo., Mi., Fr., 3x9 Mio. IE) wurde durchgeführt, worauf ein gutes Ansprechen festzustellen war. Vor Therapiebeginn wurden erneut zwei Knoten an der linken Schulter entfernt. Die Gesamtbeurteilung ergab die Diagnose eines nicht follikulären B-Zell-Lymphoms. Bei erneuter Vorstellung Ende 1997 war eine Vollremission am Rücken zu beobachten.

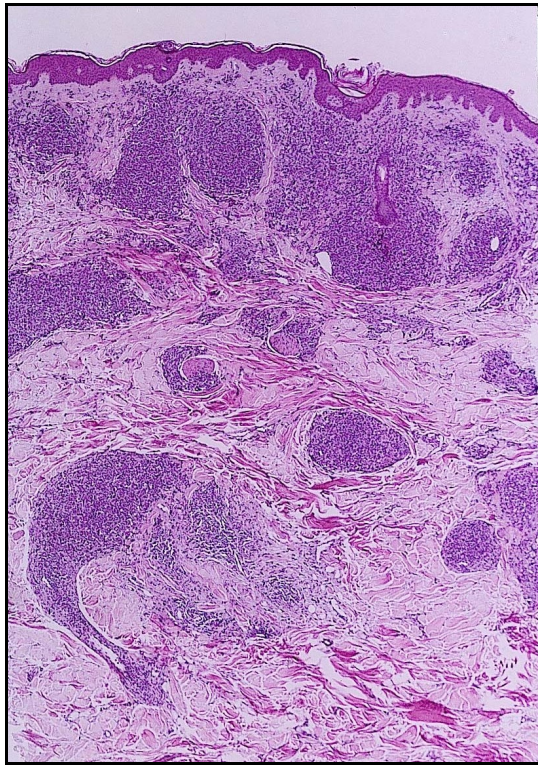


Abbildung 6: HE-Färbung eines histologischen Präparates des kutanen B-Zell-Lymphoms vom Patienten LB; 10fach vergrößert

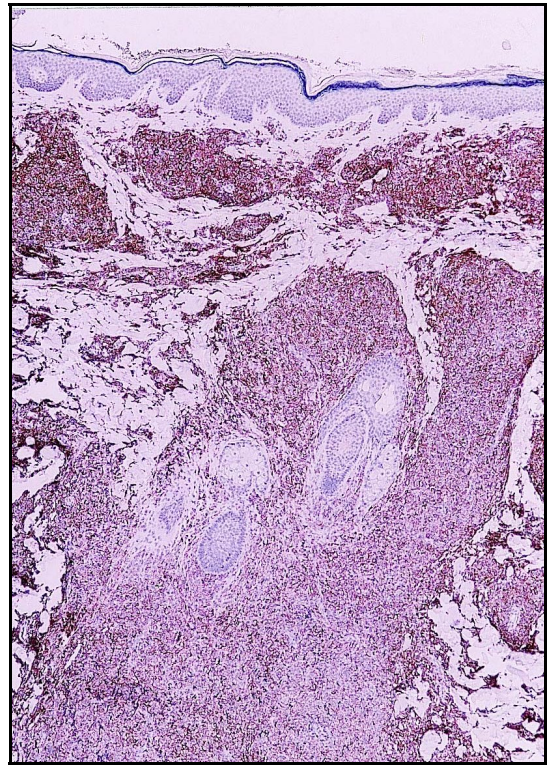


Abbildung 7: Übersicht mit Färbung des CD20 Oberflächenmarkers der B-Zellen; 15fach vergrößert;

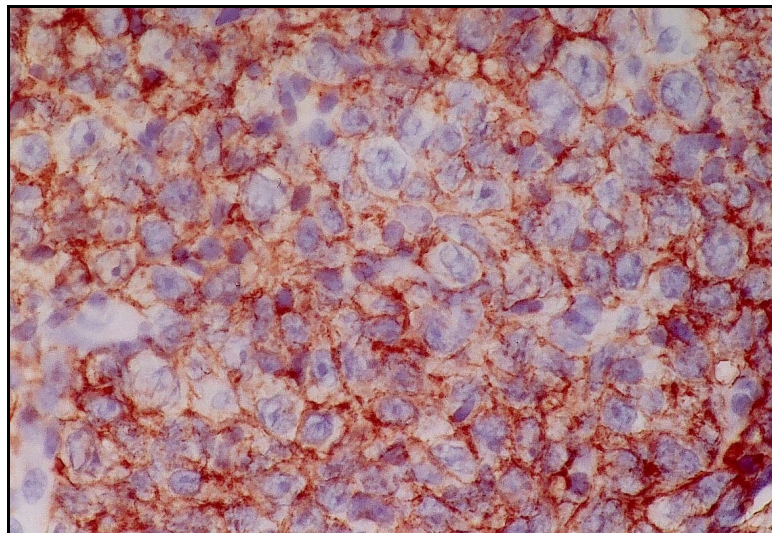


Abbildung 8: Darstellung der CD20 positiven B-Zellen in 160facher Vergrößerung

3.2 Verwendete Geräte, Reagenzien und Chemikalien

3.2.1 Präparatfärbung

Kryostat FRIGOCUT 2800 Leica, Bensheim, GER

Primärantikörper:

Maus-Anti-Human-B-Cell,CD20, L2 Dako Diagnostika, Hamburg, GER

Kaninchen-Anti-Human-T Cell, CD3 Dako Diagnostika, Hamburg, GER

Sekundärantikörper:

Ziege-Anti-Maus IgG + IgM Dianova, Hamburg, GER

Ziege-Anti-Kaninchen IgG Dianova, Hamburg, GER

Tris Buffered Saline (TBS), ad 1l, pH 7,5:

Tris-Base 0,9 g Merck, Darmstadt, GER

Tris-HCL 6,85 g Merck, Darmstadt, GER

NaCl 8,78 g Merck, Darmstadt, GER

Streptavidin-Alkalische Phosphatase BioGenex, Mainz, GER

Neufuchsin Sigma, Deishofen, GER

Naphtol AS-BI Phosphate Sigma, Deishofen, GER

3.2.2 Mikromanipulation

Umkehrmikroskop DIAPHOT 300 Nikon, Düsseldorf, GER

Micropipette Puller PB-7 Narishige, Tokyo, Japan

Pipette Grinder EG-40 Narishige, Tokyo, Japan

Micropipette GD-1 Narishige, Tokyo, Japan

3.2.3 Proteinase-Verdau und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Thermocycler Biometra, Göttingen, GER

Multi Ultra PCR Tubes (1. Runde PCR) Sorenson, Salt Lake City, USA

Mineral Oil Sigma, Deishofen, GER

RNA, 5S-ribosomal Boehringer Mannheim, Mannheim, GER

Proteinase K Boehringer Mannheim, Mannheim, GER

Expand High Fidelity PCR System (PCR 1. Runde) Boehringer Mannheim, Mannheim, GER

AmpliTaq®DNA Polymerase, with GeneAmp® Roche Molecular Systems, Branchburg, USA

(PCR 2.Runde) Perkin Elmer, Foster City, USA

JumpStart™ dNTP	BioVentures, Murfreesboro, USA
Oligonukleotid-Primer	Biotez, Berlin, GER

3.2.4 Gelelektrophorese

Agarose Gel 2%:

Agarose (UltraPure™) 2g	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, GER
1x TBE 100 ml	

Ethidiumbromid (UltraPure™) 10µl	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, GER
----------------------------------	--

TBE 10x:

Tris-Base 108g	Sigma, Deishofen, GER
----------------	-----------------------

Borsäure 55g	Merck, Darmstadt, GER
--------------	-----------------------

EDTA 0,5 M, pH 8,0 40ml	Merck, Darmstadt, GER
-------------------------	-----------------------

1kb DNA-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, GER
----------------	--

3.2.5 Reinigung der PCR-Produkte, Isolierung der DNA-Fragmente

High Pure PCR Product Purification Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim, GER
--	------------------------------------

Agarose Gel DNA Extraction Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim, GER
--------------------------------	------------------------------------

3.2.6 Sequenzierung

373 DNA Sequencer	Applied Biosystem, Weiterstadt, GER
-------------------	-------------------------------------

Sequence Analysis und Sequence Navigator Software	Applied Biosystem, Weiterstadt, GER
---	-------------------------------------

DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
--	--------------------------------

Natriumacetat	Merck, Darmstadt, GER
---------------	-----------------------

Formamid	Merck, Darmstadt, GER
----------	-----------------------

Ethanol (70% und 95%)	Charité, Apotheke
-----------------------	-------------------

EDTA	Merck, Darmstadt, GER
------	-----------------------

Dextran Blau	Sigma, Deishofen, GER
--------------	-----------------------

Sequenziergel :

Harnstoff 30 g	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, GER
----------------	--

Acrylamid 7,125 ml	Pharmacia Diagnostics, Freiburg, GER
--------------------	--------------------------------------

10x TBE 6 ml	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, GER
--------------	--

APS 10%, 180 µl	Sigma, Deishofen, GER
-----------------	-----------------------

TEMED 24µl	Amresco, Solon, USA
------------	---------------------

3.3 Methoden

3.3.1 Entnahmestellen des Tumormaterials

Aus dem Tumorexzisat von WS wurden per 5x5 mm durchmessenden Stanzbiopsien Gewebeproben entnommen. Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung des zum Entnahmezeitpunkt ca. 8 cm umfassenden Tumors und die Entnahmestellen des Materials.

Von Patient LB wurden von dem Gesamtexzisat im Januar 1997 insgesamt acht getrennt lokalisierte Stanzbiopsien entnommen. Der Tumor war zum Zeitpunkt der Entfernung ebenfalls nahezu rund mit einem Durchmesser von ca. 6 cm (Abbildung nicht dargestellt).

Der Abstand der entnommenen Gewebeproben bei Patient LB betrug jeweils mindestens 1 cm und wurde analog der Abbildung 9 durchgeführt.

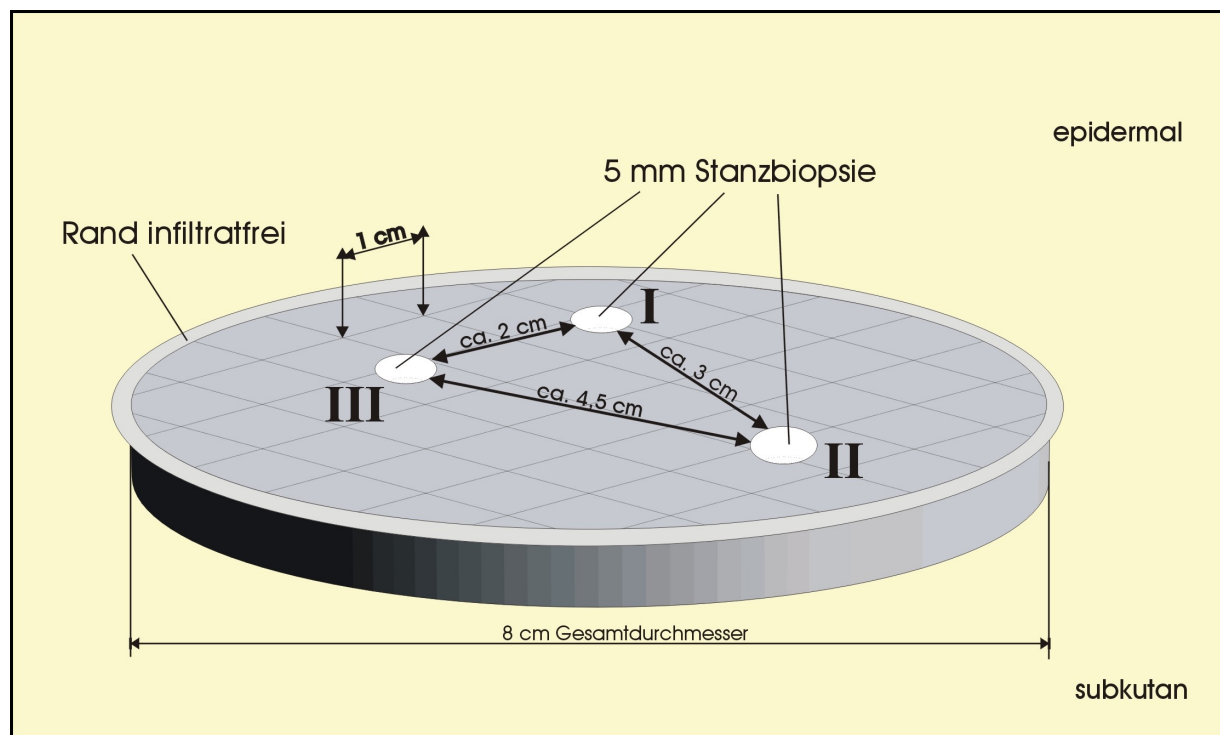


Abbildung 9: Entnahmestellen der untersuchten Gewebeproben (I-III) in Abhängigkeit von der Lokalisation im Gesamttumorexzisat bei Patient WS

3.3.2 Schnitt und Anfärbung der Biopsien

Die operativ gewonnenen Biopsien und Tumorexzisate wurden nach der Entnahme kryokonserviert. Es folgte das Schneiden der Präparate in 10 µm dicke Gewebsschichten. Diese wurden mit Aceton fixiert und mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert (Dauer: 1h). Direkt im Anschluß erfolgte die Färbung der B-Zellen mit dem Maus-Anti-Human-B-Cell, CD20, L26 Antikörper. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle der Kaninchen-Anti-Human-T-Cell, CD3 Antikörper für die T-Zell-Färbung verwendet.

Die Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus (IgG + IgM) und Ziege-Anti-Kaninchen (IgG) wurden im folgenden Reaktionsschritt für 30 Minuten hinzugegeben. Es folgte der nach jeder Inkubation obligatorische Waschschrift mit Tris Buffered Saline (TBS). Streptavidin-Alkalische Phosphatase wurde für weitere 30 Minuten hinzugefügt, um sich an die biotinylierten Sekundärantikörper zu binden. Der entstandene Komplex (in CD20/CD3-positiven Zellen) konnte anschließend mit Neufuchsin und Naphtol-AS-Bisphosphat, für die Mikromanipulation erkenntlich, rot angefärbt werden. Die so behandelten und gefärbten Präparate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in Tris-HCl (0,5 M; pH 7,6) aufbewahrt.

3.3.3 Mikromanipulation der Einzelzellen

Die Methode der Mikromanipulation ist vor allem durch den Einsatz in der Reproduktionsmedizin bekannt geworden. Die in-vitro-Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) sind etablierte Verfahren, welche sich dieser Methode bedienen.

Unsere Arbeitsgruppe verwendet die Mikromanipulation, um markierte Einzelzellen aus einem Gewebeverband zu isolieren. Ein Mikroskop (Nikon) mit bis zu 600facher Vergrößerung läßt die CD20 positiven B-Zellen in den vorliegenden 10 µm dicken histologischen Schnitten gut erkennbar werden. Glaskapillaren, die mit dem hydraulischen Mikromanipulationsgerät bewegt werden, wurden zuvor spitz gezogen (*Micropipette Puller*) und im Anschluß angeschliffen (*Pipette Grinder*). Sie dienen als Werkzeuge zur Mobilisierung der Zellen. Nach einer fotografischen Übersichtsaufnahme konnte mit Hilfe von zwei Glaskapillaren eine positiv markierte Zelle aus dem Gewebeverband gelöst und durch Erzeugung von Unterdruck in eine Glaskapillare aspiriert werden. Die so gewonnene Einzelzelle wurde als Produkt für die erste Runde der PCR in ein Reaktionsgefäß überführt, das 20 µl 1x PCR Puffer und 1ng/µl 5 SrRNA enthielt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20°C. Die 5 SrRNA dient dazu, das Binden der DNA an der Gefäßwand der Reaktionsgefäße zu vermeiden.

3.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) der Einzelzellen

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist seit über 10 Jahren eine in der molekularbiologischen und medizinischen Wissenschaft etablierte Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren (49). Die Amplifikation von DNA aus Einzelzellen gelang Li *et al.* Ende der achtziger Jahre (50). Um einen bestimmten Bereich der genomischen DNA zu amplifizieren, verwendet man Oligonukleotidprimer, die zu den flankierenden DNA-Sequenzen der gewünschten Region komplementär sind. Die Denaturierung der DNA und das Vorhandensein eines Primerüberschusses machen es möglich, daß sich beim erneuten Zusammenlagern die Oligonukleotide an die komplementären Stränge binden können (*annealing*). Eine Polymerase benutzt die genomische DNA als Matrize und verlängert die Primer um das gewünschte DNA-Stück. Durch wiederholte Zyklen kommt es zur Amplifikation des durch die Primer flankierten Fragmentes. Die sogenannte *nesting* Strategie beinhaltet zwei verschiedene PCR-Runden. Nach der ersten Amplifikationsrunde wird nur ein kleiner Anteil für die zweite Runde entnommen und mit zwei neuen Primern amplifiziert, die weiter *intern* binden als das erste Primerpaar (*nesting*). *Seminesting* bedeutet, daß nur ein Primer des Paares, welches die Ziel-DNA im zweiten Amplifikationsschritt flankiert, weiter *intern* ansetzt (Abbildung 10).

Die Einzelzellen enthaltenden Reaktionsgefäße wurden mit einem Tropfen Mineralöl (SIGMA) überschichtet, um das Reaktionsgemisch vor Verdampfung während des Reaktionsvorganges zu schützen und in den Thermocycler (Biometra) überführt. Nach der Zugabe von 0,6 µl Proteinase K (0,25 mg/ml) und dem anschließenden Verdau startete die 1. Runde der von uns verwendeten zweistufigen, *seminested* PCR zur Amplifizierung der rearrangierten Immunglobuline (V_H , V_K , V_λ). Der Verdau, eine Inkubation bei 55°C für 55 min, mit anschließender Temperaturerhöhung auf 95°C für 10 min zur Inaktivierung des Enzyms, dient dazu, die DNA in der Zelle für die PCR-Reaktion zugänglich zu machen.

Für die anschließende PCR-Reaktion wurden bei einem Ansatzvolumen von 50 µl folgende Chemikalien (Boehringer Mannheim) hinzugegeben:

1. Runde $V_H/V_K/V_\lambda$ (Endkonzentrationen):

7 nM	jedes Primers
200 μ M	dNTP
2,5 mM	MgCl ₂
5 μ l	10x PCR-Puffer

Der Primermix beinhaltete die familienspezifischen 6 V_H -, 6 V_K - bzw. je 9 V_λ - 5'-Primer und jeweils drei *externe* J_H -, J_K - bzw. J_λ - 3'-Primer. Im Reaktionsgemisch lag jeder Primer mit einer Konzentration von 7 nM vor. Die Tabellen 5, 6 und 7 zeigen die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und Abbildung 10 die Bindungsstellen an den Immunglobulinen für die erste und zweite Runde der PCR.

Jeweils 3,5 U einer hitze-resistenten Taq-DNA-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (51;52) wurden nach dem ersten Denaturierungsschritt durch das Öl hinzupipettiert.

Der die Amplifikation einleitende Zyklus bestand aus dem Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min, einem Primer *annealing* bei 65°C für 2 min und dem Extensionsschritt bei 72°C für 1 min. Darauf folgten 35 Runden des Drei-Schritt-Zyklus 95°C - 1 min, 59°C - 30 s, 72°C - 1 min mit Abschluß eines Extensionsschrittes bei 72°C für 5 min. Eine von 10 Proben enthielt als Negativkontrolle eine CD3 positive T-Zelle.

In der zweiten Runde der PCR wurde je ein 1 μ l des Produktes der ersten Runde eingesetzt. Der Ansatz beinhaltete 50 nM je eines der familienspezifischen 5'-Primer. In der anderen Richtung kamen vier ($J_{H_{int}}/J_{K_{int}}$) bzw. drei ($J_{\lambda_{int}}$) weiter *intern* gelegene J-3'-Primer zum Einsatz, ebenfalls aufgelistet in Tabelle 5, 6 und 7, die wie in der ersten Runde der PCR zu jeder Reaktion gepoolt hinzugefügt wurden.

Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l der 2. Runde enthielt folgende Chemikalien (Perkin Elmer, für V_K Boehringer Mannheim):

Tabelle 4: Reaktionsansätze für die 2. Runde der PCR

2. Runde	VH	Vκ	Vλ
Produkt (PCR 1. Runde)	1 µl	1 µl	1 µl
familienspezifischer 5'-Primer (V)	50 nM	50 nM	50 nM
3'-Primer (J _{intern})	50 nM	500 nM	50 nM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM
MgCl ₂	1,5 mM	1,0 mM	1,5 mM
10x PCR-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	1,25 U	1,25 U	1,25 U

Tabelle 5: Primer für die leichte Kette LAMBDA

Vλ 1	GGT CCT GGG CCC AGT CTG TG	20
Vλ 2	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT	21
Vλ 3a	CTC AGC CAC CCT CAG TGT CCG T	22
Vλ 3b	CTC AGC CAC CCT CGG TGT CAG T	22
Vλ 4	TTT CTT CTG AGC TGA CTC AGG AC	23
Vλ 6	GAG TCT CCG GGG AAG ACG GTA	21
Vλ 7	GTG GTG ACT CAG GAG CCC TCA C	22
Vλ 8	ACT GTG GTG ACC CAG GAG CCA	21
Vλ 9	CCT GTG CTG ACT CAG CCA CCT	21
Jλ 1 _{ext}	GCC ACT TAC CTA GGA CGG TGA C	22
Jλ 2,3 _{ext}	GAA GAG ACT CAC CTA GGA CGG TC	23
Jλ 6,7 _{ext}	GGA GAC TYA CCG AGG ACG GTC	21
Jλ 1 _{int}	GGA CGG TGA CCT TGG TCC CAG T	22
Jλ 2,3,7 _{int}	GAC GGT CAG CTT GGT SCC TCC	21
Jλ 6 _{int}	GAC GGT CAC CTT GGT GCC ACT	21

Tabelle 6: Primer für die leichte Kette KAPPA

Vκ 1	GAC ATC CRG WTG ACC CAG TCT CCW TC	26
Vκ 2	CAG WCT CCA CTC TCC CTG YCC GTC A	25
Vκ 3	TTG TGW TGA CRC AGT CTC CAG SCA CC	26
Vκ 4	AGA CTC CCT GGC TGT GTC TCT GGG C	25
Vκ 5	CAG TCT CCA GCA TTC ATG TCA GCG A	25
Vκ 6	TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AA	26
Jκ 1,2 _{int}	TTG ATY TCC ASC TTG GTC CCY TGG C	25
Jκ 3 _{int}	TTG ATA TCC ACT TTG GTC CCA GGG C	25
Jκ 4 _{int}	TTG ATC TCC ACC TTG GTC CCT CGG C	25
Jκ 5 _{int}	TTA ATC TCC AGT CGT GTC CCT TGG C	25
Jκ 1,2,4 _{ext}	ACT CAC GTT TGA TYT CCA SCT TGG TCC	27
Jκ 3 _{ext}	GTA CTT ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CC	29
Jκ 5 _{ext}	GCT TAC GTT TAA TCT CCA GTC GTG TCC	27

Tabelle 7: Primer für die schwere Kette

VH 1	CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C	25
VH 2	GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAC A	25
VH 3	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG	26
VH 4	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C	25
VH 5	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A	25
VH 6	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	25
JH 1,4,5 _{int}	GAC GGT GAC CAG GGT KCC CTG GCC	24
JH 2 _{int}	GAC AGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC	24
JH 3 _{int}	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC	24
JH 6 _{int}	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTK GCC	24
JH 1,2,4,5 _{ext}	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	24
JH 3 _{ext}	TAC CTG AAG AGA CGG TGA CCA TTG T	25
JH 6 _{ext}	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT	24

zu Tabelle 5, 6, 7:

Dargestellt sind die verwendeten Oligonukleotidprimer für die Einzel-Zell-PCR zur Amplifikation der variablen Abschnitte der Immunglobulingene für die schwere und die leichten Ketten nach Küppers *et al.* (53); angegeben in 5'-3'-Richtung; R: A/G, Y: C/T, K: G/T, S: G/C, W: A/T

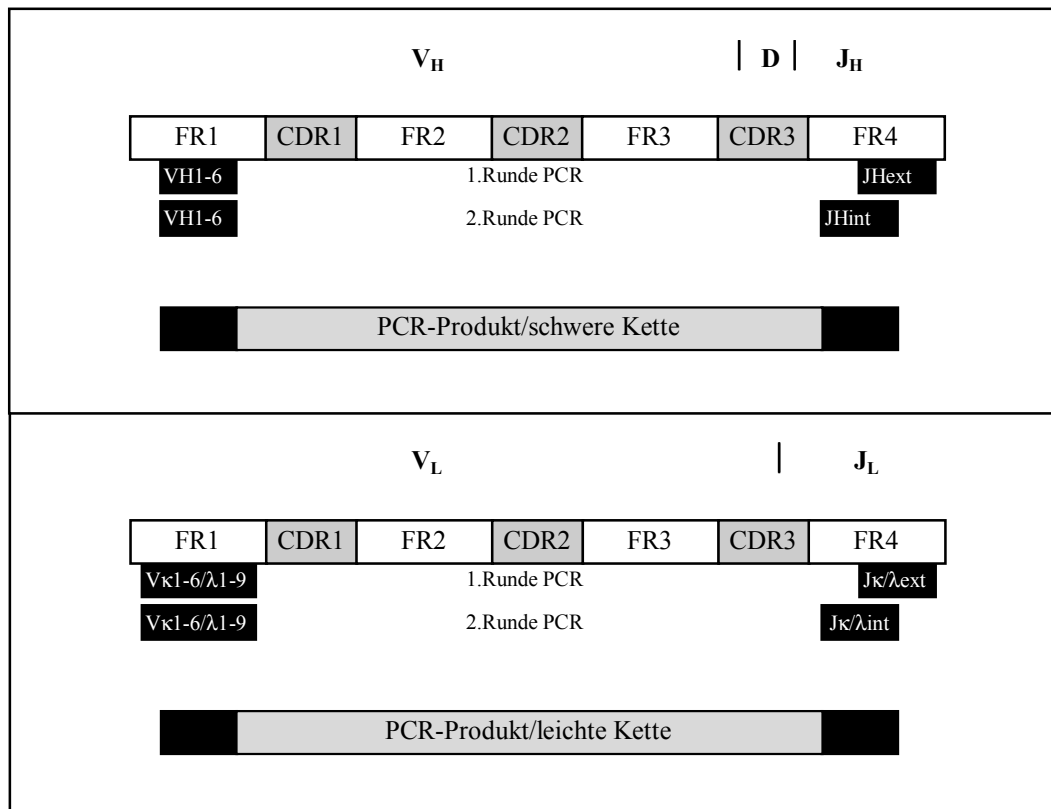


Abbildung 10: Bindungsstellen der Oligonukleotid-Primer an den Immunglobulingenen für die Amplifikation der variablen Bereiche der schweren und leichten Kette; *seminested* PCR

Für das Amplifikationsprogramm der 2. Runde der *seminested* PCR (51) wurden folgende Temperaturen und Zeiten gewählt:

Erster Zyklus : 95°C - 2 min, 68°C - 5 min (pipettieren der DNA-Polymerase), 72°C - 1 min

45 Zyklen: 95°C - 1 min, 61°C/65°C - 30 sec, 72°C - 1 min

Abschlußschritt: 72°C - 5 min

Aufgrund einer unterschiedlichen Effizienz der familienspezifischen Primer wurde beim Einsatz von V_H 3- und V_H 4-Primern die *annealing*-Temperatur in den 45 Zyklen auf 65°C erhöht. Das Amplifikationsprogramm von V_λ wurde mit 35 Zyklen (95°C - 1 min, 63°C - 30 sec, 72°C - 1 min) durchgeführt.

In der 2. Runde wurde ebenfalls eine Negativkontrolle mitpipettiert, die 1 µl der Negativkontrolle aus Runde 1. enthielt.

3.3.5 Gelelektrophorese und Reinigung der PCR-Produkte

Um die Produkte der durchgeführten PCRs zu objektivieren, wurden 5 µl der Proben nach der zweiten Runde auf ein 2%iges Agarose-Gel, das 10 µl Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Um die spezifischen Banden der amplifizierten VJ- bzw. VDJ- Rearrangements hinsichtlich der Größe zu erkennen, wurde eine 1kb DNA-Leiter mitgeführt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden einer Reinigung unterzogen, um Primer, Mineralöl, Salze, freie Nukleotide und Polymerasen, die die nachfolgende Sequenzierung beeinträchtigen könnten, zu entfernen. Eindeutige, scharfe Banden in der Gelelektrophorese, die auf geringere unspezifische Amplifikate schließen lassen, wurden mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Boehringer Mannheim) bearbeitet. Bei diesem Reinigungsverfahren werden die Reaktionsprodukte direkt aus der PCR-Reaktion aufgereinigt. In speziellen Reaktionsgefäßen (*Filter-Tube-Einheiten*) wurde zu den verbleibenden 45 µl der Proben das fünffache Volumen eines Nucleinsäure-Bindungspuffers hinzugefügt und anschließend 30 sec zentrifugiert. Die Nukleinsäuren konnten so von dem in den Reaktionsgefäßen enthaltenen Glasfaservlies absorbiert werden. Nach zwei folgenden „Waschschritten“ (Zugabe von Waschpuffer versetzt mit Ethanol) folgte die Eluierung der Proben in 30 µl bidestilliertem Wasser.

Bei unreinen oder sogar Doppelbanden (Auftreten einer zweiten Bande neben der spezifischen) in der Elektrophorese erwies sich der Einsatz des *Agarose Gel DNA Extraction Kits* (ebenfalls Boehringer Mannheim) als effizientere Methode. Hier erfolgte die Isolierung der DNA-Fragmente mittels TBE-Agarosegelen. Der gesamte PCR-Ansatz (45 µl) wurde auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach einer Elektrophoreselaufzeit von ca. 90 min bei 80 V konnten die spezifischen Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt werden. Nach dem Auswiegen der einzelnen Agarosefragmente wurde das dreifache Volumen eines Agarose-Lösungspuffers und eine die Nukleinsäuren absorbierende Silica-Matrix hinzugefügt, bei 60°C 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Wie bei der zuerst beschriebenen Reinigung folgte die Zugabe des DNA-Bindungspuffers, zwei Waschvorgänge und die Elution in 30 µl bidestilliertem Wasser. Jeder Schritt zog eine Zentrifugation von 30 sec und ein Verwerfen des Überstandes nach sich. Die Trennung der Silica-Matrix von der eluierten DNA erfolgte im letzten Zentrifugationsschritt.

Abschließend wurde mit 5 µl der gereinigten Produkte eine Erfolgskontrolle durchgeführt, die der Gelelektrophorese im Anschluß an die 2. Runde der PCR entsprach.

3.3.6 Direktsequenzierung der PCR-Produkte

Die Ausgangsmenge der DNA (1-10 µl) für die Sequenzreaktion wurde anhand der Intensität der Banden in der Erfolgskontrolle der Reinigung ermittelt. Bei einem Ansatzvolumen von 20 µl wurden, außer der DNA, 5 µl *Ready Mix* (AmpliTaQ DNA Polymerase, dNTPs, dITP und fluoreszenzmarkierte ddNTPs) aus dem *Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer), sowie 2,5 µM eines familienspezifischen Primers verwendet. Während des Pipettierens standen die Proben auf Eis.

Das Programm für die Sequenzreaktion gestaltete sich wie folgt:

96°C - 2 min, 25 Zyklen 96°C - 30 sec, 50°C - 15 sec, 60°C - 4 min.

Währenddessen konnte ein 4,75%iges Polyacrylamidgel hergestellt werden. Ein Gemisch bestehend aus 30,0 g Harnstoff, 7,125 ml Acrylamid, 6,0 ml 10x TBE und 25,375 ml bidestilliertem Wasser wurde nach dem Lösen durch einen Filter (0,2 µm) gegeben und für 10 min entgast. Anschließend wurden 180 µl APS (Ammoniumpersulfatlösung) und 24 µl TEMED (Sigma) hinzugefügt und die Gellösung nach Aufnahme in eine Spritze zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um das Gel polymerisieren zu lassen, verweilten die Glasplatten 2 h in horizontaler Lage.

Die Produkte der Sequenzreaktion wurden für die Sequenzierung vorbereitet. Zuerst mußten sie unter dem, auch bei dieser Reaktion verwendeten, Mineralöl behutsam abpipettiert werden, um mit jeweils 2 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6) sowie 50 µl 95%igem Ethanol versetzt werden zu können. Nach gründlichem Vortexen, 10 minütiger Lagerung auf Eis, 30 min Zentrifugation bei 14 000 U/min und Verwerfen des Ethanolüberstandes folgte ein weiterer Waschvorgang der DNA mit 250 µl 70%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 min. Wieder wurde der Alkohol entfernt und die Proben bei Zimmertemperatur getrocknet.

Für die nun folgende nichtradioaktive Sequenzierung (54) wurden die Pellets in 4 µl eines Ladepuffers, bestehend aus 100 µl Formamid, 20 µl EDTA und 20 µl Dextran Blau gelöst, bei 90°C für 2 min denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert.

Pro *Slot* wurden 3,5 µl der Proben aufgetragen und der Sequenzlauf in einem *373 DNA Sequencer* (Applied Biosystem) bei 1600 V, 25 mA für 10 h gestartet.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit der *Sequence Navigator*™ Software (Applied Biosystem). Jedes PCR-Produkt der 2. Runde wurde in 5'-3' mit dem entsprechenden

V'-Primer sequenziert, bei nicht eindeutigen oder fehlenden Ergebnissen auch in 3'-5' Richtung mit einem J'-Primer. Die Hin- und Rücksequenzen konnten gegeneinander *alignent* werden, um Fehlinterpretationen zu vermeiden und eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Bei Differenzen wurde die Sequenzierung wiederholt.

Der Vergleich der analysierten Sequenzen mit den möglichen Keimbahngenenen erfolgte *online* über die *ImMunoGeneTics* Datenbank (Lefranc MP, Nucleic Acids Research 1998, 26:297-303, Montpellier, France) und die *V Base sequence directory* Datenbank (I.M. Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engeneering, Cambridge, UK), um die am meisten homologe Keimbahnsequenz zu ermitteln.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzanalysen der Tumorzellen des Patienten WS

4.1.1 Lymphomzellanalyse des Patienten WS

Das seit einem Jahr bestehende Keimzentrumszell-Lymphom am linken Hinterkopf des Patienten WS hatte zum Zeitpunkt der Exzision einen Durchmesser von ca. 8 cm.

Von drei entnommenen Stanzbiopsien (**I**, **II**, **III**) des parietal-occipital gelegenen Tumors mit definiertem räumlichen Abstand zueinander (Abbildung 9), wurden insgesamt 100 Tumorzellen mikromanipuliert und analysiert (**I** = 37, **II** = 27, **III** = 36 Zellen).

Die aus den histologischen Schnitten gewonnenen CD20 positiven Einzelzellen durchliefen eine *seminested* PCR mit Hilfe spezifischer Primer (Darstellung der verwendeten Oligonukleotide in den Tabellen 5, 6 und 7), in der die rearrangierten Immunglobulingene amplifiziert wurden.

Die Produkte der zweiten Runde der PCR, in der jeweils nur ein familienspezifischer V'-Primer zum Einsatz kam, wurden auf einem Agarose-Gel unter UV-Licht objektiviert.

Nach erfolgter Reinigung der Amplifikate mit erwarteter Länge, konnten die PCR-Produkte mit dem *373 DNA Sequencer* (Applied Biosystem) direkt sequenziert werden.

Für die schwere Kette konnte kein Amplifikationsprodukt gewonnen werden. Für die variable Region der leichten Kette wurden insgesamt 24 V κ J κ -Rearrangements mit Sequenzen der V κ 3-Familie gefunden und analysiert.

Tabelle 8: Ergebnisübersicht der Einzelzellanalyse des Patienten WS

Biopsie	Anzahl mikro-manipulierter Zellen	Anzahl der PCR-Amplifikate	V κ J κ -Rearrangement/Subklon
I	37	16	12 WSV κ 3C
II	27	9	3 WSV κ 3A 5 WSV κ 3B
III	36	9	4 WSV κ 3D
Summe	100	34	24

Die Differenz zwischen Amplifikat und untersuchtem Rearrangement ist auf Verunreinigungen bzw. auf Verluste bei dem Reinigungsvorgang vor der Sequenzierung zurückzuführen.

Von den 34 visualisierten PCR-Amplifikaten konnten 31 direkt sequenziert werden. Von den 12, als nicht zum Tumorklon zugehörig charakterisierten Sequenzen, konnte eine in der laboreigenen Sequenzdatenbank gefunden und als Verunreinigung identifiziert werden. Acht weitere erwiesen sich bei der Auswertung der Direktsequenzierung als überlagert und aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit als nicht auswertbar. Die Ursache ist auch hier vermutlich eine auf Verunreinigungen beruhende zusätzliche Sequenzinformation. Drei Proben waren nach dem Reinigungsvorgang auf dem Agarose-Gel nicht mehr sichtbar und lieferten keine Sequenzinformationen.

Die Sequenzen des rearrangierten V κ -Gens wurden *online* gegen alle bekannten Keimbahngene verglichen. Das in der internationalen *ImMunoGeneTics* Datenbank ermittelte am meisten homologe Keimbahngen wird nach der Nomenklatur von Barbie V und Lefranc MP **IGKV3-20*1** genannt (55). Nach COX *et al.* (1994) ist es mit dem V κ -Keimbahngen DPK22 identisch (56).

Die Keimbahnsequenz wurde mit den Lymphomzell-Sequenzen des Patienten WS verglichen. Die aus den Tumorzellen stammenden V κ J κ Sequenzen weisen gegenüber dem Keimbahngen diverse Punktmutationen auf. Alle identischen Sequenzen wurden zu einer Konsensus-Sequenz mit den Initialen des Patienten und der amplifizierten V κ -Familie zusammengefaßt. Es konnten, bei insgesamt 24 gefundenen V κ J κ -Rearrangements, vier verschiedene Subklone für die leichte Kette identifiziert werden (gleicher Großbuchstabe hinter der Sequenzbezeichnung). Die intraklonale Diversität erscheint hier keinesfalls zufällig, sondern in Abhängigkeit von der Entnahmestelle der Biopsie. Erstaunlich ist, daß sich jeweils ein Subklon auf eine Biopsie beschränkt. So ist die Sequenz WSV κ 3C nur in Biopsie **I**, die Sequenz WSV κ 3D ausschließlich in Biopsie **III** und die beiden Subklone WSV κ 3A und WSV κ 3B nur in Biopsie **II** zu finden. Die Verwandtschaft der vier verschiedenen Subklone, also die Entwicklung aus einer naiven putativen B-Vorläuferzelle ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen. Abbildung 12 zeigt die Nukleotidsequenzen der Lymphomzellen im Vergleich zum Keimbahngen. Das Verhältnis von Austauschmutationen (R = *replacement*) und stillen (S = *silent*), erstere verändern die Aminosäuresequenz, wird im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

4.1.2 Mutationsanalyse der V-kappa-Immunglobulingene des Patienten WS

Die gefundenen Tumorsequenzen wurden mit der Keimbahngensequenz verglichen und ausgewertet (Abbildung 12). Für den gefundenen Klon aus der Biopsie **I** WSV κ 3C ergab sich bei einer analysierten Länge von 258 Nukleotiden eine Mutationsrate von 6,2%. Das bedeutet,

daß gegenüber dem Keimbahngen 16 Nukleotide mutiert sind.

Bei der Sequenz WSVκ3A und WSVκ3D sind je 13 Nukleotide bei der Sequenz WSVκ3B 14 Nukleotide ausgetauscht, das entspricht einer Mutationsrate von 5,04% bzw. 5,43%.

Die Mutationsverteilung über das gesamte Gen wird in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 9: Verteilung der R- (replacement) und S- (silent) Mutationen (R/S) in den Vκ-Genen der Lymphomzellen des Patienten WS.

	FR1 R / S	CDR1 R / S	FR2 R / S	CDR2 R / S	FR3 R / S	CDR3 R / S	Insgesamt FR1,2,3	Insgesamt CDR1,2,3
WSVκ3A	0 / 1	3 / 1	0 / 1	2 / 1	0 / 1	1 / 2	0 / 3	6 / 4=1,5
WSVκ3B	0 / 1	4 / 1	0 / 1	2 / 1	0 / 1	1 / 2	0 / 3	7 / 4=1,75
WSVκ3C	0 / 1	5 / 0	0 / 3	2 / 1	0 / 1	1 / 2	0 / 5	8 / 3=2,6
WSVκ3D	0 / 1	2 / 2	0 / 1	2 / 1	0 / 1	1 / 2	0 / 3	5 / 5=1

Die entsprechenden Aminosäuresequenzen werden in Abbildung 13 dargestellt.

Ob ein Nukleotidaustausch zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt (Austauschmutation/R-Mutation) oder nicht (stumme/S-Mutation), wird durch den genetischen Code bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation eine Kodierungsänderung bewirkt, ist für jedes Triplet unterschiedlich.

Eine Häufung funktionell aktiver Austauschmutationen in den antigenbindenden Bereichen, also in den CDRs bzw. eine Anhäufung von stummen Mutationen in den FRs zur Erhaltung der Struktur, deutet auf eine antigenabhängige Entwicklung hin. Als Maßstab gilt nicht die absolute Mutationsrate, sondern das Verhältnis von R- zu S-Mutationen (R/S-Ratio) in den CDRs bzw. FRs.

Um statistische Mutationsanalysen durchführen zu können, müssen die beobachteten R/S-Ratios der Lymphomsequenzen mit der intrinsischen R/S-Ratio (R/S_{int} = erwartete Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation zur Änderung der Aminosäuresequenz führt) des rekombinierten Keimbahngens verglichen werden. Die Abbildung 11 und Tabelle 10 zeigen die intrinsische R/S-Ratio des Keimbahngens IGKV3-20*1 getrennt für die Bereiche CDR und FR.

Die Einteilung der antigenbindenden Bereiche (CDRs) und der strukturbewahrenden Bereiche (FRs) erfolgt nach der Definition von Kabat *et al.* (28).

[illegible]

Abbildung 11: intrinsische R/S Ratio für jedes Triplet des Keimbahngens ab Position 11

Tabelle 10: Zusammenfassung: Verteilung der R/S-Ratio für die Bereiche CDR und FR

Keimbahngen	FR1 R / S (11-23)	CDR1 R / S (24-34)	FR2 R / S (36-49)	CDR2 R / S (50-56)	FR3 R / S (57-88)	CDR3 R / S (ab89)	Insgesamt FR1,2,3	Insgesamt CDR1,2
IGKV3-20*1	79/34	83/20	97/28	45/18	215/65	44/13	391/127= 3,08	172/51= 4,61

CDR 1																													
	15							20					25					30					31	31a	32	35			
IGKV3-20*1	CTG	TCT	TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	GTT	AGC	AGC	AGC	TAC	TTA	GCC	TGG	TAC		
WSVK3A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	-C-	--t	---	CT-	---	---	---	---		
WSVK3B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	---	---	C--	---	---	-C-	--t	---	CT-	---	---	---	---		
WSVK3C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	-C-	--A	---	CT-	---	-T-	---	---		
WSVK3D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	-C-	--t	--t	-T-	---	---	---	---		

CDR 2																											
	40							45					50					55					60				
IGKV3-20*1	CAG	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	GCT	CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGC	AGG	GCC	ACT	GGC	ATC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT
WSVK3A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	T--	--a	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WSVK3B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	T--	--a	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WSVK3C	--a	--a	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	T--	--a	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
WSVK3D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	T--	--a	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	65					70					75					80					85					90	
IGKV3-20*1	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGA	CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	GTG	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG
WSVK3A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--c	---	---	---	---	--a
WSVK3B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--c	---	---	---	---	--a
WSVK3C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--c	---	---	---	---	--a
WSVK3D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--c	---	---	---	---	--a

CDR 3													
	95							98					
IGKV3-20*1	TAT	GGT	AGC	TCA	CCT	TAC	ACT	TTT					
WSVK3A	-T-	---	--t	---	---	---	--g	---					
WSVK3B	-T-	---	--t	---	---	---	--g	---					
WSVK3C	-T-	---	--t	---	---	---	--g	---					
WSVK3D	-T-	---	--t	---	---	---	--g	---					

Abbildung 12: Vergleich der Nukleotidsequenzen der V κ -Gene der Lymphomzellen des Patienten WS mit dem Keimbahngen IGKV3-20*1. Unter dem veröffentlichtem Keimbahngen sind die vier verschiedenen Subklone (A-D) mit Kennzeichnung der Mutationen (stumme Mutation = Kleinbuchstabe; Austauschmutation = Großbuchstabe) dargestellt. Ein „-“ deutet auf homologe Nukleotide hin.
Referenz zum angegebenen Keimbahngen IGKV3-20*1: (55)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3
Kappa	_____V _H _____					___J _K ___
IGKV3-20*1	LSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSP
WSVK3A	-----	-----T--L--	-----	-S-R--	-----	--F---- YTF
WSVK3B	-----	-----R-T--L--	-----	-S-R--	-----	--F---- YTF
WSVK3C	-----	-----TR-L-V	-----	-S-R--	-----	--F---- YTF
WSVK3D	-----	-----T--F--	-----	-S-R--	-----	--F---- YTF

Abbildung 13: Abgeleitete Aminosäuresequenzen des Keimbahngens und der V_K-Gen-Sequenzen für die variable Region der leichten Kette der Lymphomzellen des Patienten WS

Aminosäureaustausche im Vergleich zum Keimbahngen sind *fett* gedruckt, „-“ steht für übereinstimmende Aminosäuren.

4.2 Sequenzanalysen der Tumorzellen des Patienten LB

4.2.1 Lymphomzellanalyse des Patienten LB

Dem subscapulär gelegenen primär kutanen B-Zell-Lymphom des Patienten LB wurden insgesamt 8 Stanzbiopsien (I-VIII) entnommen, nachdem der zu diesem Zeitpunkt 6x6 cm umfassende Tumor Anfang 1997 vollständig exzidiert wurde. Die Biopsien stammen aus einem Tumorrezidiv nach einer Strahlentherapie 1995, die vorerst zur Regression führte.

Aus den Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von jeweils 5 mm wurden insgesamt 126 CD20 positive Einzelzellen untersucht. Die in den Zellen rearrangierten Ig-Gene wurden wiederum in einer *seminested*-PCR analysiert. Das PCR-Produkt der ersten Runde (gepoolter Einsatz der Primer) jeder Zelle wurde als Matrize für die 2. Runde eingesetzt. Hier wurde je ein familienspezifischer Primer für die schwere und die leichte Kette des variablen Abschnittes der Immunglobulingene verwendet.

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel von 7 PCR-Produkten erwarteter Länge. Bahn 1 und 2 stellen Amplifikate eines rearrangierten Immunglobulins der leichten Kette (V λ 3b-Familie), die Bahnen 5-9 Amplifikate der schweren Kette (V H 4-Familie) des Patienten LB dar.

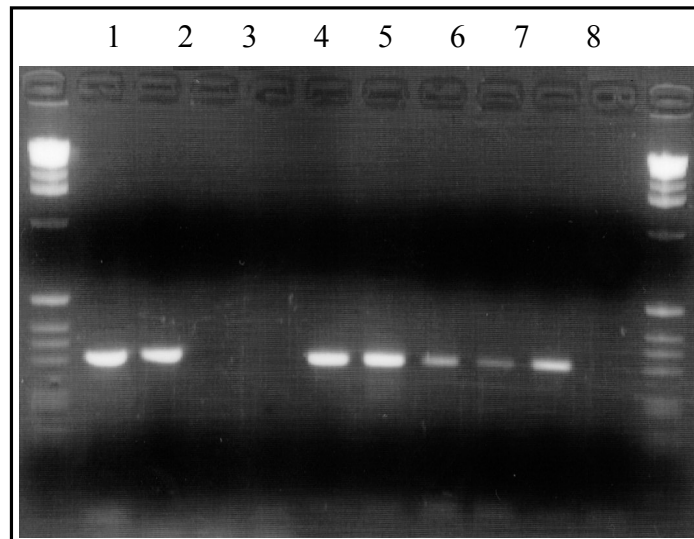


Abbildung 14: Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten mit verwendeten V λ 3b-J λ 2,3,7int (Bahn 1,2) und V H 4-JH1,4,5int Primern (Bahn 5-9)

Die nach der Reinigung folgende Direktsequenzierung bestätigte die Familienzugehörigkeit der rearrangierten Immunglobulingene für die schwere und leichte Kette.

Die Tabellen 11 und 12 zeigen eine Übersicht der Ergebnisse der untersuchten Zellen. Gleiche Sequenzen wurden auch hier zu Konsensus-Sequenzen mit den Initialen des Patienten und der V-Familie zusammengefaßt und durch einen hinten angefügten Buchstaben einem Subklon zugeordnet. Großbuchstaben kennzeichnen Sequenzen für die schwere Kette, angefügte Kleinbuchstaben bezeichnen ein Rearrangement der leichten Kette.

Tabelle 11: Übersicht der Einzelzellanalyse des Patienten LB für die Immunglobulingene der schweren Kette des kutanen B-Zell-Lymphoms

Biopsie	Anzahl mikro-manipulierter Zellen	Anzahl der PCR-Amplifikate	V_HDJ_H-Rearrangement
I	18	5 V _H 4	4 LBV _H 4A
II	18	7 V _H 4	7 LBV _H 4A
III	18	4 V _H 4	1 LBV _H 4A
IV	18	6 V _H 4	6 LBV _H 4A
V	18	16 V _H 4	16 LBV _H 4A
VI	9	7 V _H 4	6 LBV _H 4A
VII	9	2 V _H 4	2 LBV _H 4A
VIII	18	6 V _H 4	2 LBV _H 4A
Summe	126	53	44

Tabelle 12: Übersicht der Einzelzellanalyse für die Immunglobulingene der leichten Kette

Biopsie	Anzahl mikro-manipulierter Zellen	Anzahl der PCR-Amplifikate	VλJλ-Rearrangement/ Subklon
I	18	5 Vλ3b	4 LBVλ3ba
II	18	7 Vλ3b	7 LBVλ3ba
III	18	4 Vλ3b	-
IV	18	2 Vλ3b	-
V	18	12 Vλ3b	9 LBVλ3ba 1 LBVλ3bd
VI	9	8 Vλ3b	6 LBVλ3ba 1 LBVλ3bd
VII	9	-	-
VIII	18	5 Vλ3b	2 LBVλ3ba 1 LBVλ3bd
Summe	126	43	31

Bei der Suche nach dem Keimbahngen wurde in der *ImMunoGeneTics* Datenbank für die schwere Kette das Keimbahngen **IGHV4-59*3** (57) identifiziert.

Insgesamt wurden in 46 Zellen aus allen acht Biopsien V_HDJ_H-Rekombinationen der V_H4-Familie gefunden, die im Vergleich zum Keimbahngen Mutationen aufweisen.

In 44 Einzelzellen lag eine identische Immunglobulinen-Sequenz (LBV_H4A) vor (s. Tabelle 11), die in allen Gewebeausschnitten wiedergefunden werden konnte.

Lediglich zwei Zellen, beide aus Biopsie **III**, wiesen einen Unterschied zu dieser Sequenz auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine der divergierenden Sequenzen besaß eine zusätzliche Austauschmutation an Position 72 (FR 3) (AAC \leftrightarrow GAC), die andere Sequenz hingegen war im Vergleich zur Sequenz LBV_H4A an Position 79 (FR 3) stumm mutiert (TCT \leftrightarrow TCC). Die Sequenzen konnten in die Auswertung nicht mit einbezogen werden, da es sich um Ergebnisse handelt, die nur in einer Zelle gefunden werden konnten. Grundlage der zuverlässigen Interpretation von Punktmutationen mittels der Einzel-Zell-PCR-Technik ist das Vorliegen in zwei verschiedenen Zellen aus jeweils unterschiedlichen PCR-Reaktionen.

Von den verbleibenden 7 PCR-Amplifikaten konnten 4 nicht sequenziert (Verlust bei der Reinigung) und drei als laboreigene Gene (Verunreinigungen) identifiziert werden.

Abbildung 17 zeigt die Sequenz LBV_H4A der schweren Kette des Immunglobulins der Lymphomzellen des Patienten LB im Vergleich zum Keimbahngen.

Das Keimbahngen für die leichte Kette des Immunglobulins wurde in der selben Datenbank ermittelt und wird als **IGLV3-21*2** (58) bezeichnet. Es ist mit dem Keimbahngen LV318 (59) identisch.

In 34 Fällen wurde ein Rearrangement für die leichte Kette der V λ 3b-Familie identifiziert, wobei in 3 Biopsien kein Sequenzprodukt erhalten werden konnte. Es wurden 28 identische V λ J λ -Rearrangements gefunden und mit LBV λ 3ba bezeichnet werden. Sechs divergierende Sequenzen wiesen zusätzliche Mutationen im Vergleich zum Keimbahngen auf. Drei sind in sich identisch (LBV λ 3bd) und bilden einen Subklon. Es handelt sich um eine zusätzliche stumme Mutation (CAC \leftrightarrow CAT) im Bereich FR 1. Sie konnte in drei verschiedenen Zellen, in je einer anderen Biopsie (**V,VI,VIII**), gefunden werden und gilt deshalb als bestätigt. Die verbleibenden drei Sequenzen mit individuellen Unterschieden, in Form je einer zusätzlichen stummen bzw. je einer Austauschmutation, kamen jeweils nur in einer Zelle vor (jede aus einer anderen Biopsie)

und wurden deshalb nicht in die Auswertung mit einbezogen (Sequenzen nicht dargestellt).

Die Lymphomzell-Sequenzen für die leichte Kette im Vergleich zum Keimbahngen sind in Abbildung 18 dargestellt.

In insgesamt 24 Zellen konnten die Rearrangements sowohl für die leichte als auch für die schwere Kette gefunden werden. Die Kombination der Sequenzen war 20x LBV_H4A/LBVλ3ba, 2x LBV_H4A/LBVλ3bd (Biopsie **V,VI**), sowie 2x LBV_H4A/LBVλ3bb (Biopsie **VIII**) und LBV_H4A/LBVλ3be (Biopsie **I**). Die Sequenzen LBVλ3bb und LBVλ3be gehören zu den einmaligen Funden.

Die Kombination LBV_H4A/LBVλ3ba war in allen Biopsien vorhanden, in denen für die schwere und die leichte Kette Produkte gewonnen werden konnten (Biopsie **I,II,V,VI,VIII**).

Es soll erwähnt werden, daß in den (elf) mitgeführten Negativkontrollen kein PCR-Produkt entdeckt wurde.

4.2.2 Mutationsanalyse der VH-Immunglobulingene des Patienten LB

Die Sequenz LBV_H4A, die in allen Biopsien vorhanden war, wurde einer Mutationsanalyse unterzogen. Die einmalig vorliegenden Sequenzen fanden keine Berücksichtigung. Bei einer Länge von 216 Nukleotiden und 29 mutierten Nukleotiden gegenüber dem Keimbahngen, ergibt sich eine Mutationsrate von 13,4% bzw. eine Keimbahnidentität von 86,6%. Die Mutationsverteilung über das Tumorgen stellt sich tabellarisch wie folgt dar:

Tabelle 13: R/S-Ratios des Tumor-VH-Gens des Patienten LB

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	Insgesamt	Insgesamt
	R / S	R / S	R / S	R / S	R / S	FR1,2	CDR1,2
LBV _H 4A	2 / 1	2 / 1	1 / 2	7 / 3	7 / 3	10/ 6= 1,66	9 / 4= 2,25

Die intrinsische R/S-Ratio für das rekombinierte Keimbahngen IGHV4-59*3 wurde ermittelt, um weitere statistische Mutationsanalysen durchführen zu können.

Die Darstellung der Keimbahnsequenz in Abbildung 15 erfolgt ab Position 25, da die Sequenzinformation der Einzelzellanalyse (in Anbetracht der verwendeten Primer) erst ab dieser Stelle verlässliche Informationen bietet.

	25				30				35				40						
	6/3	6/3	6/3	6/3	7/2	8/1	8/1	6/1	6/1	7/0	8/1	7/0	7/2	5/4	7/1	6/3			
IGHV4-59*3	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC			
	45				50				55										
	6/3	6/3	7/1	5/3	5/4	7/1	7/0	7/2	6/3	6/1	7/2	6/1	6/1	8/1	6/3	8/1	6/3	8/1	6/1
CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	
	60				65				70				75						
	8/1	6/3	6/3	6/3	7/1	8/1	4/4	6/3	6/3	7/2	4/3	6/3	8/1	6/3	6/3	7/1	8/1	7/1	8/1
AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAA	TTC	
	80				82a 82b 82c				85				90						
	6/3	5/4	7/1	5/4	5/4	8/1	6/3	6/3	6/3	6/3	8/1	6/3	6/3	6/3	6/1	6/1	7/1	6/3	
TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG		

Abbildung 15: intrinsische R/S Ratio für jede Tripletkombination des Keimbahngens ab Position 25

Tabelle 14: Zusammengefaßte Verteilung der R/S-Ratio für das gesamte Keimbahngen der schweren Kette

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	Insgesamt	Insgesamt
Keimbahngen	R / S	R / S	R / S	R / S	R / S	FR1,2,3	CDR1,2
	(25-30)	(31-35)	(36-49)	(50-65)	(ab 66)		
IGHV4-59*3	39/15	35/ 4	88/30	108/27	195/73	322/118= 2,73	143/31= 4,61

Der Bereich der CDR 3 wurde nicht in die Analyse miteinbezogen, da er durch Rekombination (Insertion von N-Sequenzen) und einen hohen Anteil an somatischen Mutationen für statistische Mutationsanalysen nicht sicher auswertbar ist. Das zugehörige D-Gen kann häufig nicht eindeutig ermittelt werden (60). Die Aminosäuresequenz der schweren Kette mit Kennzeichnung der Austauschmutationen ist in Abbildung 19 dargestellt.

4.2.3 Mutationsanalyse der V λ -Immunglobulingene des Patienten LB

Die Mutationsanalyse für das identifizierte Vλ3b-Gen wurde nach gleichem Schema wie für die schwere Kette durchgeführt. Die zwei gefundenen Subklone LBVλ3b**a** und LBVλ3b**d** weisen gegenüber dem mit der höchsten Wahrscheinlichkeit bei der Rekombination verwendeten Keimbahngen IGLV3-21*2 (58) 27 bzw. 28 Punktmutationen auf. Das ergibt eine Mutationsrate von 10,7% für Sequenz LBVλ3b**a** und 11,1% für Sequenz LBVλ3b**d** bei insgesamt 252 analysierten Nukleotiden. Die Verteilung der Mutationen ist in Tabelle 15 zu sehen. Die lediglich einmal vorkommenden Sequenzen wurden keiner Mutationsanalyse unterzogen.

Tabelle 15: R/S-Ratios der V λ -Gene der Lymphomzellen des Patienten LB

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	Insgesamt	Insgesamt
	R / S	R / S	R / S	R / S	R / S	R / S	FR1,2	CDR1,2
LBVλ3ba	1 / 1	3 / 0	5 / 1	2 / 1	4 / 4	5 / 0	10/ 6= 1,66	10/ 1= 10,0
LBVλ3bd	1 / 1	3 / 1	5 / 1	2 / 1	4 / 4	5 / 0	10/ 6= 1,66	10/ 2= 5,0

Der Bereich der CDR 3 wurde hier mitberücksichtigt, soweit er eindeutig dem V-Gen zuzuordnen war. Die Aminosäuresequenzen mit Kennzeichnung der produktiven Austauschmutationen sind in Abbildung 20 zu sehen.

Es folgt die Ermittlung der intrinsischen R/S-Ratio für das Keimbahngen IGLV3-21*2, getrennt für die nach Kabat *et al.* definierten Bereiche CDR und FR (28) (Abbildung 16; Tabelle 16). Für die leichte Kette beginnt die Analyse ab Nukleotidposition 14.

	15					20					25									
	6/3	6/3	5/3	7/1	6/3	6/3	7/2	7/2	6/3	7/1	6/3	5/3	8/1	8/1	7/2	5/3				
I GLV3-21*2	GCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	AGG	ATT	ACC	TGT	GGG	GGA	AAC	AAC	ATT	GGA				
	35					40					45									
8/1	7/1	8/1	6/3	8/1	7/0	6/1	7/1	7/1	7/1	6/3	6/3	7/1	6/3	6/3	6/3	5/4	6/3	6/3		
AGT	AAA	AGT	GTG	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	GCC	CCT	GTG	CTG	GTC	GTC		
	50					55					60					65				
6/1	8/1	8/1	8/1	8/1	5/4	6/3	4/3	6/3	7/2	6/3	7/1	4/4	8/1	6/3	6/3	6/3	8/1	6/3		
TAT	GAT	GAT	AGC	GAC	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAG	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAC	TCT		
	70					75					80					85				
6/3	8/1	6/3	6/3	6/3	5/4	6/3	7/2	8/1	7/2	6/3	7/1	6/3	6/3	8/1	7/1	6/3	8/1	6/1		
GGG	AAC	ACG	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC	AGG	GTC	GAA	GCC	GGG	GAT	GAG	GCC	GAC	TAT		
	90					90														
6/1	7/1	7/1	6/3	7/0	8/1	8/1	8/1	8/1	8/1	8/1										
TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAT	AGT	AGT	AGT	GAT	CAT										

Abbildung 16: Keimbahngen IGLV3-21*2 der leichten Kette mit intrinsischer R/S-Ratio für jede Position

Tabelle 16: Zusammenfassung der intrinsischen R/S-Ratio für das Keimbahngen

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	Insgesamt	Insgesamt
Keimbahngen	R / S (14-23)	R / S (24-34)	R / S (35-49)	R / S (50-56)	R / S (57-88)	R / S (ab 89)	FR1,2,3	CDR1,2
IGLV3-21*2	63/24	76/20	94/31	47/14	208/71	68/10	365/126= 2,90	191/44= 4,34

[illegible]

Abbildung 17: Nukleotidsequenzen der V_H-Region der Tumorzellen des Patienten LB im Vergleich zum Keimbahngen IGHV4-59*3 (57)

	CDR1																														
	15					20					25					27	28					30	31	31a 31b		32	35				
IGLV3-21*2	GCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	AGG	ATT	ACC	TGT	GGG	GGA	AAC	AAC	ATT	GGA	AGT	AAA	AGT	GTG	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG						
LbVλ3b a	---	--c	---	---	---	---	---	---	T--	---	---	---	G--	--A	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	--C	tT-						
LbVλ3b d	---	--c	---	---	---	---	---	---	T--	---	---	---	G--	--A	---	---	-A-	---	---	---	--t	---	---	--C	tT-						
	CDR2																														
	40					45					50					55					60										
IGLV3-21*2	AAG	CCA	GGC	CAG	GCC	CCT	GTG	CTG	GTC	GTC	TAT	GAT	GAT	AGC	GAC	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAG	CGA	TTC	TCT						
LbVλ3b a	---	T--	---	---	-G-	---	---	G--	---	---	---	---	---	--t	--G	---	---	G--	--a	---	TG-	--C	---	A--	---						
LbVλ3b d	---	T--	---	---	-G-	---	---	G--	---	---	---	---	---	--t	--G	---	---	G--	--a	---	TG-	--C	---	A--	---						
	65					70					75					80					85										
IGLV3-21*2	GGC	TCC	AAC	TCT	GGG	AAC	ACG	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC	AGG	GTC	GAA	GCC	GGG	GAT	GAG	GCC	GAC	TAT	TAC	TGT						
LbVλ3b a	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	--g	---	---	---	---	---	---	---	--t	---						
LbVλ3b d	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--t	---	---	--g	---	---	---	---	---	---	---	--t	---						
	CDR3												JL2/JL3																		
	90					95					100																				
IGLV3-21*2	CAG	GTG	TGG	GAT	AGT	AGT	AGT	GAT	CAT	CC		G	GTA	TTC	GGC																
LbVλ3b a	---	---	---	---	TC-	-T-	GT-	---	---	--		-	A--	---	---																
LbVλ3b d	---	---	---	---	TC-	-T-	GT-	---	---	--		-	A--	---	---																

Abbildung 18: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Vλ-Region der Tumorzellen des Patienten LB mit dem Keimbahgen IGLV3-21*2 (58)

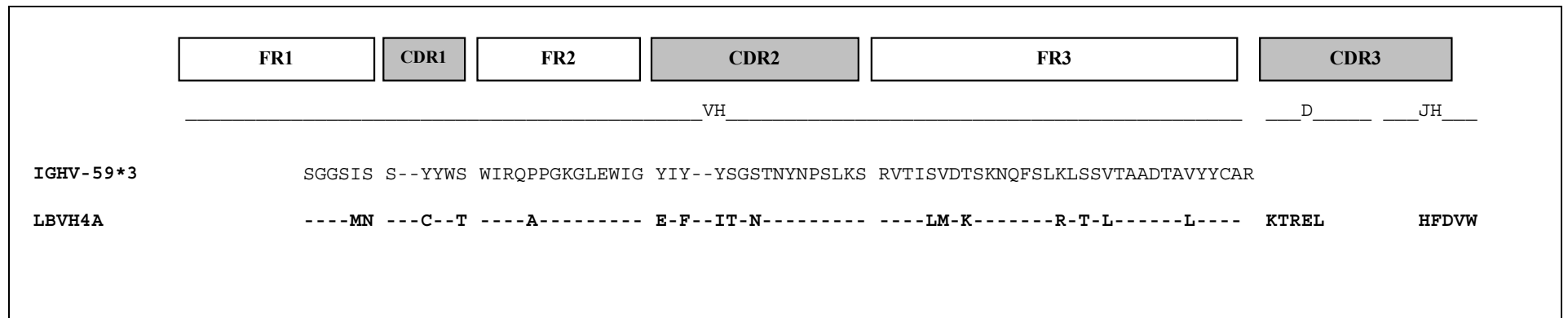


Abbildung 19: Abgeleitete Aminosäuresequenz des Keimbahngens und der V_H-Gen-Sequenz für die variable Region der schweren Kette der Lymphomzellen des Patienten LB.

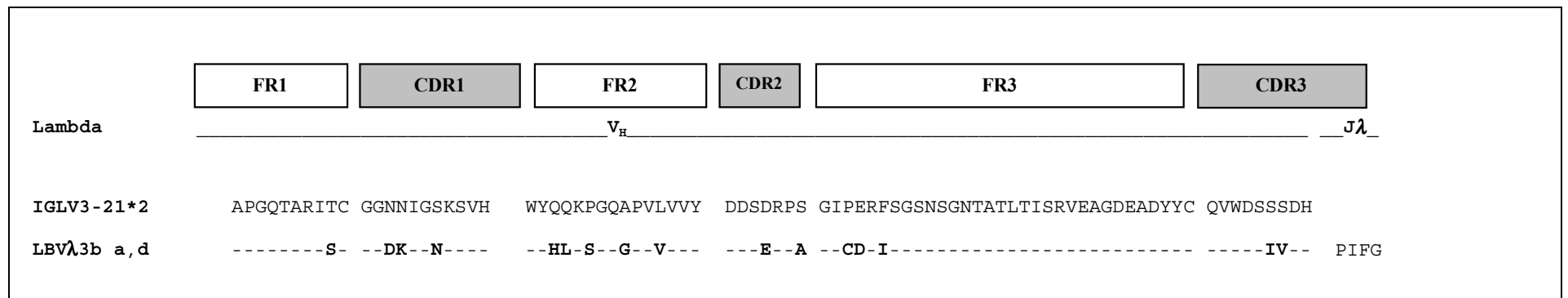


Abbildung 20: Abgeleitete Aminosäuresequenzen des Keimbahngens und der Vλ-Gen-Sequenzen für die variable Region der leichten Kette der Lymphomzellen des Patienten LB

Aminosäureaustausche im Vergleich zum Keimbahngen sind *fett* gedruckt, „-“ steht für übereinstimmende Aminosäure

5 Diskussion

Auf dem Forschungsgebiet der Lymphomerkrankungen allgemein und der kutanen B-Zell-Lymphome im besonderen, wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt, um der immer noch weitestgehend unklaren Pathogenese ein Stück näher zu kommen und für die Behandlung eine einheitliche Strategie zu entwickeln.

Mit der Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Techniken in der Medizin und deren Gebrauch in der Routinediagnostik konnte ein großer Beitrag geleistet werden, diese Erkrankungsgruppe besser zu differenzieren und eindeutiger Aussagen über Diagnose, Therapie und Prognose machen zu können.

Das Merkmal der genetischen Klonalität einer Lymphozytenpopulation läßt maligne Entartungen exakt von reaktiven, gutartigen Tumoren unterscheiden.

Die Unterscheidung „Pseudolymphom“ oder malignes B-Zell-Lymphom wurde früher häufig diskutiert (11), ersteres kann heute eindeutig einem reaktiven, polyklonalen Prozeß (lymphoide Hyperplasie) und letzteres einer malignen Neoplasie zugeordnet werden (19).

Um den bisher sichersten Diagnoseparameter für das Vorhandensein eines malignen Lymphoms, die Klonalität einer Lymphozytenpopulation, nachzuweisen, wurden seit Ende der 70er Jahre verschiedene Verfahren entwickelt.

Das sogenannte Southern-Blotverfahren (Blot-Verfahren nach Southern) fand aufgrund des intensiven Arbeitsaufwandes und des hohen Anspruchs an Quantität und Qualität der aus einem lymphozytären Tumor extrahierten DNA keine Anwendung in der Routinediagnostik.

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verfügt man über eine Methode, die einen exakten, raschen und nicht radioaktiven Nachweis klonaler Zellpopulationen liefern kann (61). Mit der Einzel-Zell-PCR-Technik kommt die Möglichkeit hinzu, in einem Infiltrat die rearrangierten Immunglobulingene nicht mehr nur qualitativ, sondern individuell von einzelner B-Zelle zu B-Zelle genau zu bestimmen und geringste Sequenzunterschiede hervorzuheben.

Kleinste B-Zell-Klone können so nachgewiesen werden (mit Populationsanalysen nicht möglich), und das Aufzeigen von intraklonaler Diversität ist mit dieser eleganten Technik optimal zu untersuchen.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der Polymerase-Ketten-Reaktion könnten neben einer präzisen Diagnostik auch eine Therapiesteuerung sowie ein patientenspezifisches *Monitoring* sein, das

frühzeitig den Nachweis von Rezidiven aufzeigen und Hinweise auf eine Progression des Tumorgewebes geben könnte (13).

Kutane B-Zell-Lymphome sind maligne Entartungen der B-Lymphozyten in der Haut.

Da B-Lymphozyten primär in der Haut nicht vorhanden sind (62), wurde früher an einen reaktiven Vorgang oder an eine Absiedlung im Rahmen von systemischen Lymphomen gedacht.

Der eher gutartige Verlauf der PKBZL, im Gegensatz zu den nodalen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), prägte vor der Entwicklung von Immunhistochemie und Molekularbiologie den Begriff Pseudolymphom. Mit der Anerkennung als eigene Krankheitsgruppe wurden viele Versuche unternommen, eine Klassifikation zu finden (Kiel-Klassifikation, REAL) (5;63).

Das Modell der *Cutaneous lymphoma studie group* der EORTC basiert auf dem aktuellsten Wissenstand und grenzt die primär kutanen B-Zell-Lymphome eindeutig von den nodalen NHL ab (12).

Die Untersuchung der Immunglobulingene sowie die Analyse der Mutationsrate und Mutationsmuster der variablen Regionen der Immunglobulingene können Rückschlüsse auf das Entwicklungsstadium geben, in dem sich die B-Zelle zum Zeitpunkt ihrer Entartung befand. Daraus ergab sich eine Einordnung der B-Zell-Malignitäten auf molekularbiologischer Grundlage.

Physiologischerweise führt die Expression von Immunglobulinen auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und der anschließende Kontakt mit einem Antigen durch B-Zell-Stimulation und spezifische T-Zell-Hilfe zur humoralen Immunantwort. In *vitro* können Wechselwirkungen zwischen naiven antigenbindenden B-Zellen und spezifischen T-Helfer-Zellen zur Produktion von Antikörpern führen. Die so erreichte B-Zellproliferation und Differenzierung (einschließlich Klassenwechsel; Isotyp) weist jedoch erhebliche Unterschiede zu der Antikörperreaktion in *vivo* auf. Insbesondere die somatische Hypermutation als Antwort auf ein, die Immunantwort induzierendes Antigen, benötigt die Eigenschaften des lymphatischen Gewebes. Die sich daraus ergebende Affinitätsreifung setzt sich zusammen aus der somatischen Hypermutation der Immunglobulingene und der Selektion von B-Zellen mit hochaffinen Oberflächenimmunglobulinen (64).

Das spezialisierte Mikromilieu der Keimzentren in den sekundär lymphatischen Organen, welche ca. 1 Woche nach Antigenstimulierung gebildet werden, ist Ort der induzierten B-Zellproliferation. Von T-Helfer-Zellen aktivierte B-Zellen entwickeln sich entweder zu

kurzlebigen Plasmazellen, die IgM oder IgG sezernieren und für die Antikörperproduktion in der Frühphase der Immunantwort verantwortlich sind oder sie wandern in die Primärfollikel, um Keimzentren auszubilden. Die in den Primärfollikeln vorhandenen B-Zellen befinden sich angelagert an follikulär dendritische Zellen (FDC). Diese verzweigten Zellen liefern vermutlich einen zentralen Beitrag zu den selektiven Vorgängen der Antikörperantwort (65).

Sie besitzen u.a. die Fähigkeit, intakte Antigene längere Zeit auf ihrer Oberfläche zu binden. Die aktivierten B-Zellen dringen in die Primärfollikel ein und beginnen mit der raschen Teilung, um Keimzentren auszubilden. Ein Proliferationszyklus dauert zwischen 3h und 6h (16;66). Die nun als Zentroblasten bezeichneten Zellen bilden in wenigen Tagen die dunkle Zone des Keimzentrums und entwickeln sich zu den Zentrozyten, die in der hellen Zone in das Netz der FDC eindringen und die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Die restlichen nicht antigenspezifischen B-Zellen werden nach außen gedrückt und bilden die Mantelzone. Während der schnellen Proliferation der Zentroblasten, die als Keimzentrumsreaktion bezeichnet wird, entstehen durch somatische Mutationen sowie Proliferations- und Selektionszyklen eine große Anzahl affiner bindender Subklone. Die Zentrozyten werden aufgrund der Präsentation eines mutierten Rezeptors auf der Oberfläche durch die FDC selektioniert (66).

Der Hypermutationsprozeß findet also in den Zentroblasten während der Keimzentrumsreaktion statt (67). Es wird dort eine Mutationsrate von einem Basenpaar pro 10^3 pro Zellteilung erreicht (68). Andere somatische Zellen weisen in ihrer DNA lediglich eine Mutationsrate von einem Basenpaar pro 10^{10} pro Zellteilung auf (69). Da der in einer B-Zelle für die variable Region der schweren und der leichten Kette kodierende Bereich ca. 360 bp lang ist und etwa drei von vier Basenaustauschvorgängen zu einer veränderten Aminosäure führen, kann man davon ausgehen, daß bei jeder Teilung jede zweite Zelle in ihrem Rezeptor eine Mutation aufweist.

Gen-Sequenzanalysen wurden u.a. bei MALT-B-Zell-Lymphomen durchgeführt. Die Zellen wiesen hypermutierte Immunglobulingene mit Bevorzugung der Punktmutationen in den antigenbindenden Bereichen auf. Die Häufung der Mutationen in den CDR-Bereichen spricht für eine antigengetriebene Selektion der Lymphomzellen bzw. ihrer Vorläufer. Intraklonale Diversität der V_H -Gensequenzen konnte bei den MALT-Lymphomen (*mucosa-associated lymphoid tissue*) u.a. von Du *et al.* gefunden werden, was die Tatsache einer Antigenstimulation, im Zusammenhang mit der klonalen Expansion, vermuten läßt (70;71).

Die Parallelen zwischen den Maltomen des Magens und den primär kutanen B-Zell-Lymphomen prägten den Begriff SALT (*skin-associated lymphoid tissue*) (20;72). SALT beschreibt eine

weitere extranodale Lokalisation von B-Zell lymphatischem Gewebe aufgrund stimulierender pathogenetischer Faktoren, wie z.B. eine chronische *Borrelia burgdorferi* Infektion (18). Dieses in der Haut erworbene Gewebe wird als Ausgangspunkt der primär kutanen B-Zell-Lymphome vermutet.

Hypermutierte Nachkeimzentrumszellen (*post-germinal center cells*) wurden ebenfalls im Multiplen Myelom (73), im nodalen monozytoiden B-Zell-Lymphom (74) und im Burkitt-Lymphom (75) gefunden. Auch das primär kutane immunoblastische B-Zell-Lymphom (großzelliges B-Zell-Lymphom der unteren Extremität) wurde in unserer Forschergruppe als Nachkeimzentrumszell-Lymphom charakterisiert (76).

Im Gegensatz dazu stehen die weniger differenzierten unmutierten Vorkeimzentrumszellen (*pre-germinal center cells*), die in B-Zell-Lymphomen, z.B. bei der chronisch lymphatischen Leukämie (48) und dem Mantelzell-Lymphom (77) zu finden sind.

Die Keimzentrumszell-Lymphome, auch *germinal center cell lymphomas* genannt, weisen das Kennzeichen der Keimzentrumsreaktion auf, die intraklonale Diversität. Zu dieser Kategorie gehört u.a. das Hodgkin-Lymphom (78) und das differenzierte großzellige B-Zell-Lymphom (79). Die Zellen sind wie ihre physiologischen Gegenstücke hypermutiert und weisen intraklonale Sequenzunterschiede auf. Eine klonale Entwicklung wurde in Veröffentlichungen über die nodalen Keimzentrumszell-Lymphome beschrieben (80;81).

Die ähnliche Anzahl von Mutationen in Keimzentrumszellen am Ende der Keimzentrumszellreaktion und den Nachkeimzentrumszellen erschwert die Unterscheidung sowie die Zuordnung der untersuchten Zellen erheblich. B-Zell-Tumoren mit typischer Verteilung und Anzahl gefundener Mutationen wurden von einigen Autoren als *post-germinal center cell*-Lymphome gewertet, da intraklonal divergierende Sequenzen nicht gefunden wurden (74;76;79).

Das fehlende Aufzeigen von intraklonalen Diversitäten bedeutet dennoch nicht, daß die Zellen in jedem Fall von Nachkeimzentrumszellen abstammen. Es ist vorstellbar, daß sie aufgrund der Methode unentdeckt blieben. Die Analyse von Tumorzellen, bzw. deren DNA, geschah bisher zumeist aus lediglich einer einzigen Biopsie. Die Ergebnisse wurden repräsentativ für das gesamte Tumorgewebe gewertet. Jedoch kann die Entnahme nur einer Biopsie nicht beweisen, daß alle Zellen des Tumors klonal identisch sind bzw. auszuschließen ist, daß an anderer Stelle des Tumors klonal divergierende Sequenzen zu finden wären.

Unsere These:

Die Untersuchung von entfernt lokalisiertem Biopsiematerial kann Sequenzunterschiede aufzeigen und somit einen Beweis für intraklonale Diversität erbringen. Die Folge ist, daß die Tumorzellen nicht von Nachkeimzentrumszellen abstammen, sondern eher den Keimzentrumszellen zu zuordnen wären.

Hinweise, ob die Hypermutationsmaschinerie noch aktiv ist oder ob eventuell Nachkeimzentrumszellen wieder in die Keimzentrumsreaktion eingetreten sind (82), können Analysen von räumlich getrennten Biopsien nicht geben. Um diese Fragen zu beantworten, müßte chronologisch Gewebematerial entnommen und in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden (83). Das Vorliegen von intraklonaler Diversität bedeutet, daß sich ein Mutationsprozeß (auch zum Zeitpunkt der Entartung) ereignet hat und schließt nicht zwangsläufig mit ein, daß andauernde Mutationen (*ongoing mutations*) noch stattfinden.

So wird von Aarts *et al.* (84) berichtet, andauernde Mutationen in V_H-Genen bei primär kutanen B-Zell-Lymphomen (1 Keimzentrumszell-Lymphom und 3 Immunozytome) gefunden zu haben. Allerdings ist eine chronologische Entnahme der untersuchten Proben aus dem Dargestellten nicht ersichtlich und die exakte Beurteilung, aufgrund der durchgeführten Populationsanalysen (PCR), schwierig (siehe Methode 5.3). Aus molekularbiologischer Sicht müßte der Terminus intraklonale Diversität gewählt werden.

Ein weiterer in Betracht zu ziehender Aspekt dieser Studie ist, daß sich drei von den sieben untersuchten Fällen (Keimzentrumszell-Lymphome) als monoklonal erwiesen (84). Auch hier wäre es vorstellbar, durch die Analyse von räumlich getrenntem Biopsiematerial evtl. Sequenzunterschiede aufzeigen zu können.

Die Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit topographisch verschiedene Stellen eines primär kutanen B-Zell-Lymphoms mittels Einzel-Zell-PCR-Technik zu untersuchen, um präzise Aussagen über die Biologie der PKBZL treffen zu können.

Durch Klonierungstechniken können intraklonale Sequenzunterschiede aufgrund der hohen Fehlerquote der Taq-DNA-Polymerase und der Formation von PCR-Hybriden (41) nicht zuverlässig interpretiert werden.

Die hier verwendete Einzel-Zell-PCR-Technik wurde mehrfach etabliert (76;85;86). Sie ist die Methode der Wahl, um Immunglobulingene in unmittelbar benachbarten bzw. räumlich getrennten B-Zellen zu analysieren und Aussagen über intraklonale Diversität zu treffen.

Kutane maligne Lymphome sind Gegenstand unserer Forschungsgruppe. Für den Einsatz und die Evaluierung der Einzel-Zell-PCR-Technik stellen sie eine methodisch leicht zugängliche, maligne B-Zell-Lymphomerkrankung dar. Es ist möglich räumlich getrennte Biopsien eines Tumors, mit einem definiertem Abstand, zu entnehmen und die variablen Genabschnitte der Immunglobulingene, in Abhängigkeit von der Lage, zu analysieren.

5.1 Intraklonale Diversität

In der vorliegenden Arbeit wurden von zwei Patienten mit kutanen B-Zell-Lymphomen entfernt lokalisierte Gewebeproben entnommen und mittels Einzel-Zell-PCR- und Sequenzieretechnik die Nukleotidsequenzen der variablen Immunglobulin-Genabschnitte vornehmlich auf intraklonale Diversität analysiert.

Bei Patient WS, wo drei Biopsien (**I,II,III**) entnommen wurden, konnten in insgesamt 100 mikromanipulierten Zellen 24 gegenüber dem Keimbahngen mutierte, klonal verwandte VJ-Rearrangements der V κ 3'-Familie gefunden werden.

Die Nukleotidsequenzen des Tumorklons zeigten sich intraklonal divers. Vier verschiedene Subklone mit Unterschieden vor allem in der CDR 1, konnten identifiziert werden (WSV κ 3 **A-D**, Abbildung 21). Tatsächlich ist eine räumliche Abhängigkeit der jeweils identischen Sequenzen zu ihrer Entnahmestelle festzustellen. Sequenz WSV κ 3**C** ist in 12 Zellen gefunden worden, die alle aus Biopsie **I** stammen. Die beiden Subklone WSV κ 3**A** und WSV κ 3**B** (Sequenz wurde 3x bzw. 5x gefunden) stammen aus Zellen der Biopsie **II**, wohingegen die viermal vorliegende Sequenz WSV κ 3**D** nur in Biopsie **III** zu finden war. Es kann hier von einer Entwicklung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle ausgegangen werden. Die putative Vorläuferzelle **X**, aus der sich alle vier gefundenen Subklone entwickelt haben könnten, ist in Abbildung 22 dargestellt. Der Subklon WSV κ 3**B** (insgesamt 14 Mutationen) weist in der CDR 1 eine zusätzliche Austauschmutation auf und könnte sich, bei ansonsten identischen Verteilungsmuster der Mutationen, aus Subklon WSV κ 3**A** (13 Mutationen) entwickelt haben. Sequenz WSV κ 3**D** (13 Mutationen) fehlt an Nukleinsäureposition 32 eine Austauschmutation, sie ist dort mit dem Keimbahngen identisch, aber außerdem an Position 31a stumm mutiert, was einen getrennten Entwicklungsweg vermuten läßt. Die eigenständige Entwicklung trifft ebenfalls für den Subklon WSV κ 3**C** (16 Mutationen) zu, der mit zwei zusätzlichen Austauschmutationen in der CDR 1 und stummen Mutationen in FR 2 ausgestattet ist. Die Unterschiede im Mutationsmuster der vier verschiedenen Sequenzen beschränken sich auf ein bis zwei Austauschmutationen in der CDR 1 sowie einige stumme Mutationen. Die Differenz der absolut

gefundenen Mutationen in den Subklonen (16-13=3) ist gering. Da die verschiedenen Austauschmutationen in jeweils mehreren Zellen und aus unabhängigen PCR-Ansätzen (hier nicht dargestellt) stammen, sprechen die Ergebnisse eher für die Genauigkeit der Methode, als für einen PCR- bzw. Sequenzierfehler. Ob die Tumorzellen zum Entnahmezeitpunkt noch an der Keimzentrumsreaktion beteiligt waren, läßt sich anhand der gefundenen Daten nicht verifizieren. Der Fund von intraklonaler Diversität an räumlich differenten Stellen des Tumors erlaubt es, aus molekularbiologischer Sicht, die Lymphomzellen den Keimzentrumszellen zu zuordnen.

Eine mögliche Entwicklung der vier Subklone aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle **X** in Abhängigkeit von der Lokalisation im Tumor zeigen die Abbildungen 21, 22.

Molekularbiologisch gelang der Nachweis einer klonalen B-Zell-Expansion für die schwere Kette der Immunglobulingene bei Patient WS nicht. Es kann sich hier um eine Deletion des V_H-Segmentes handeln oder um eine Mutation, die das Binden der von uns verwendeten Primer verhinderte. Die Existenz eines noch unbekannten V_H-Gens ist kaum vorstellbar, da der gesamte Genlocus der V_H-Gene bekannt ist (57;87).

Die immunhistochemisch nachgewiesene Expression des Apoptose-Proteins bcl-2 gilt von einigen Autoren als Hinweis auf einen systemischen Prozeß (4), ist aber in Keimzentrumszell-Lymphomen nicht zwingend an eine t(18;14) Translokation gebunden (88).

Die weiterführende Diagnostik (CT-Abdomen, Becken, Halsbereich) zum Entnahmezeitpunkt der Biopsien ergab verdächtige Areale in der Leber und Lymphknotenmanifestationen links iliakal und interaortokaval. Diese Befunde konnten in Form einer Biopsie, aufgrund einer Ablehnung durch den Patienten, nicht gesichert werden.

Es soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden, ob es sich bei diesen Befunden primär um einen systemischen Prozeß oder um Absiedlungen im Rahmen eines primär kutanen B-Zell-Lymphom handelt. In dieser Arbeit steht die Evaluierung der Methode, hinsichtlich der Möglichkeit intraklonale Diversität aufzuzeigen, im Vordergrund.

Entscheidend ist, daß zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 1996 (ein Jahr zuvor) keine extrakutane Beteiligung nachweisbar war. Laut Definition wird von einem primär kutanen B-Zell-Lymphom gesprochen, wenn zum Zeitpunkt der Diagnose keine Manifestationen außerhalb der Haut gefunden worden sind. Die Abwesenheit extrakutaner Beteiligung ist für einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten veranschlagt (12). Ein Parameter, der stark von der *compliance* des Patienten abhängt und gerade für retrospektive Studien schwierig zu beweisen ist.

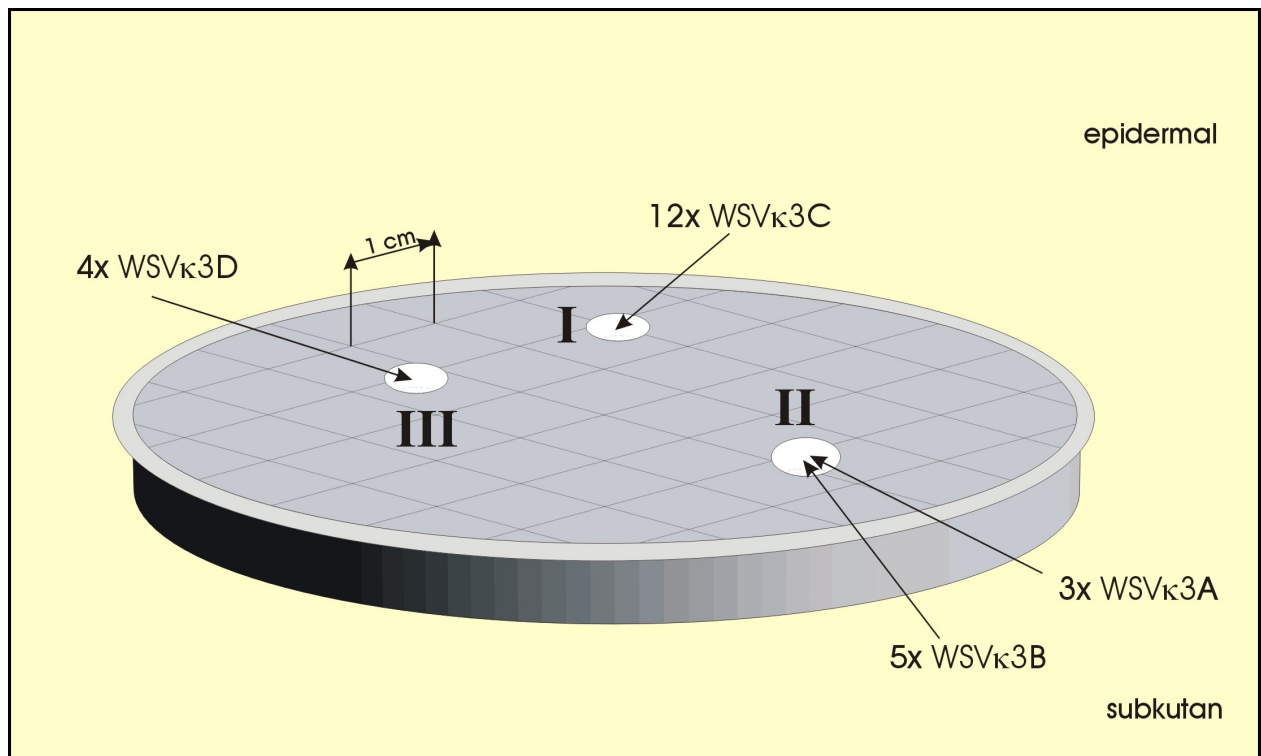


Abbildung 21: Die Anzahl der gefundenen Subklone A-D in bezug auf ihre Lokalisation im Tumorexzizat. I-III kennzeichnen die Entnahmestellen der untersuchten Biopsien

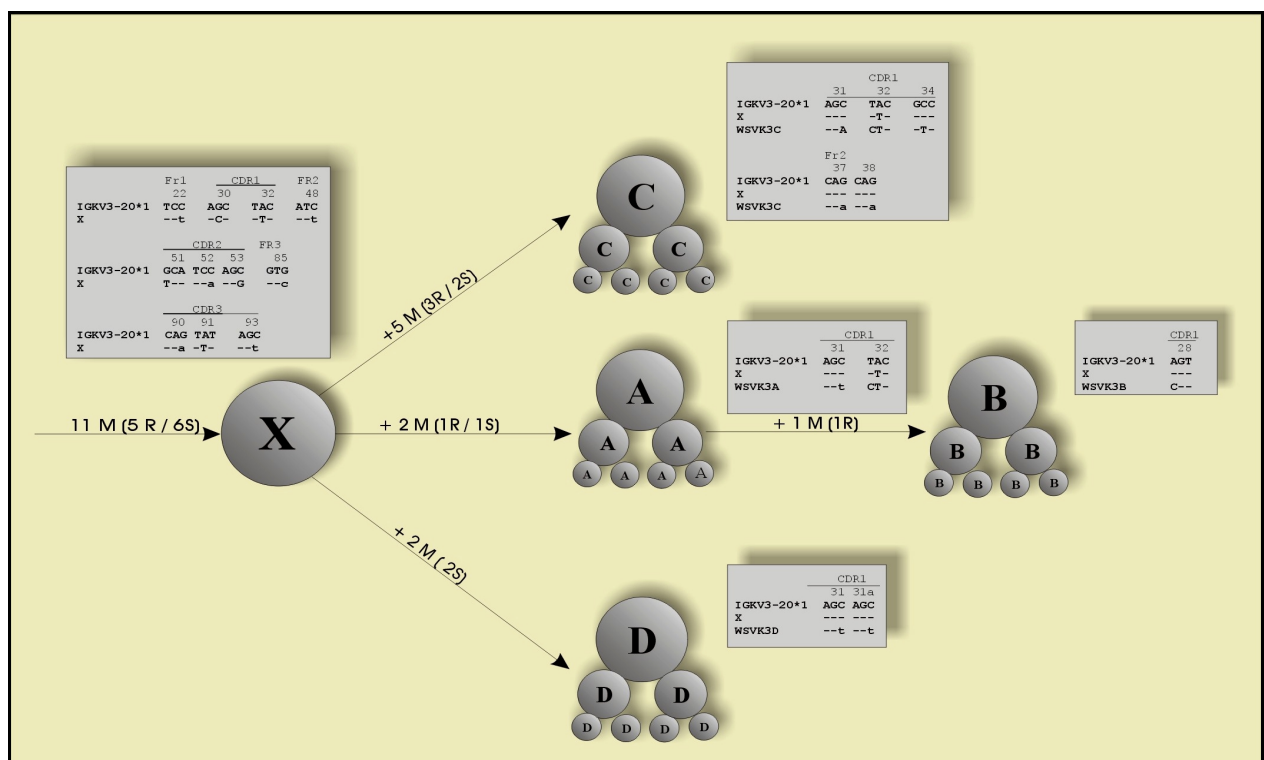


Abbildung 22: Tumorklonentwicklung in den Lymphomzellen bei Patient WS

Dargestellt ist eine putative Vorläuferzelle X mit den Mutationen, die in allen vier Subklonen (A-D) gemeinsam vorkommen. Eine mögliche Tumorklonentwicklung mit Kennzeichnung aller hinzugekommenen Mutationen, einschließlich ihrer Position, schließt sich auf der rechten Seite an.

Die Lymphomzellanalyse des Patienten LB bezog sich auf 126 Lymphomzellen, die aus insgesamt 8 Biopsien (**I-VIII**) mikromanipuliert wurden. Hier gelang es, sowohl für die schwere als auch für die leichte Kette der Immunglobulingene, klonal verwandte Rearrangements zu detektieren. Für die schwere Kette konnten 46 V_HDJ_H-Rearrangements der V_H4 Familie gefunden und die Sequenzen auf intraklonale Diversität überprüft werden. In allen acht Biopsien konnte in 44 Zellen eine identische Sequenz ermittelt werden (LBV_H4A), die mehrfach in den entfernt lokalisierten Gewebeproben vorlag. Die gefundenen Tumorzell-Sequenzen erwiesen sich als monoklonal. Die im Vergleich zum Keimbahngen mutierte Sequenz scheint, bei alleiniger Betrachtung der schweren Kette, von Nachkeimzentrumszellen abzustammen. Es ist zu erwähnen, daß in zwei Zellen klonale Unterschiede in Form einer einzigen Austauschmutation in FR 3 bzw. einer stummen Mutation ebenfalls in FR 3 entdeckt wurden (Sequenzen nicht dargestellt). Da es sich bei den beiden Sequenzen, die beide aus der Biopsie **III** stammen, um einmalige Funde handelt und sich das Ergebnis in keiner weiteren Biopsie bzw. Einzelzelle bestätigen ließ, haben wir die Ergebnisse in der Auswertung nicht in Betracht gezogen. Grundsatz für die Zuverlässigkeit jeder Methode ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bei der Einzel-Zell-PCR-Technik, vor allem bei der Frage „intraklonale Diversität ja oder nein“, kann das nur in der Form geschehen, daß Sequenzen aus verschiedenen Einzelzellen und damit unabhängigen PCR-Reaktionen wiederholt gefunden werden. Bei einmaligen Ergebnissen kann ein Fehler, z.B. der Taq-DNA-Polymerase in der ersten Runde, nicht ganz ausgeschlossen werden, obwohl die Wahrscheinlichkeit äußerst gering ist.

Für die leichte Kette der Immunglobulingene der Lymphomzellen ergab sich ein ähnliches Bild.

Die 34 analysierten VJ-Rearrangements erwiesen sich als der V λ 3b-Familie zugehörig und im Vergleich zum am meisten homologen Keimbahngen als stark mutiert (siehe Mutationsanalysen 5.2). In drei der acht Biopsien konnte kein Produkt erhalten werden. So konnten für die leichte Kette nur fünf getrennt lokalisierte Gewebeproben Berücksichtigung finden. In allen fünf Biopsien lag mehrfach eine identische Sequenz vor (LBV λ 3ba). Der Tumorklon konnte in insgesamt 28 Einzelzellen gefunden werden. Eine weitere Sequenz (LBV λ 3bd) konnte in drei Biopsien (**V,VI,VIII**) je einmal analysiert werden. Die intraklonale Diversität zu Sequenz LBV λ 3ba beschränkt sich auf eine stumme Mutation im Bereich der CDR 1 (Position 34). Da sie in drei Fällen unabhängig voneinander gefunden wurde, gilt das Ergebnis als bestätigt. Für die molekularbiologische Aussage ist eine einzige zusätzliche stumme Mutation von nicht allzu großer Bedeutung. Aber auch hier spricht es für die Methode, selbst geringfügige Unterschiede verläßlich aufzeigen zu können.

Drei weitere Sequenzen wurden nur einmalig gefunden und deshalb nicht in die sich anschließende Mutationsanalyse einbezogen.

Betrachtet man die Ergebnisse für die schwere und die leichte Kette zusammen, ist zu erwähnen, daß in 24 Zellen beide Rearrangements analysiert werden konnten. Der Tumorsequenz LBV_H4A konnte kombiniert mit LBVλ3ba und LBVλ3bd gefunden werden. Die theoretisch denkbare Möglichkeit, daß die Rearrangements der schweren bzw. der leichten Kette aus zwei unabhängig voneinander entarteten Zellen stammen, ist folglich nicht gegeben.

In einer einzigen Zelle die variablen Abschnitte der Immunglobulingene für die schwere und leichte Kette zu identifizieren und deren Nukleotidsequenzen mit großer Zuverlässigkeit zu analysieren, ist eine einzigartige Leistung der Einzel-Zell-PCR-Technik.

Trotz des relativ großen Aufwandes, acht getrennt lokalisierte Gewebeproben zu untersuchen, konnten keine funktionellen, d.h. die Aminosäuresequenz verändernden, intraklonalen Unterschiede ausgemacht werden. Eine Teilnahme der Zellen an aktiven Mutationsvorgängen des Keimzentrums ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Molekularbiologisch stammen die hypermutierten Zellen von Nachkommen der Keimzentrumzellen ab. Die Möglichkeit, eine klonale Entwicklung der Lymphomzellen aufzuzeigen, ist hier nicht gegeben, da intraklonale Unterschiede zu gering sind.

Die Klassifikation betrachtend, könnte der Tumor ein Marginalzonen B-Zell-Lymphom sein, welches mit den MALT-Lymphomen häufig verglichen worden ist (8;89).

5.2 Statistische Mutationsanalysen

Mutationsanalysen lassen eine Aussage darüber zu, in welchem Entwicklungsstadium sich die physiologische B-Zelle zum Zeitpunkt der Untersuchung bzw. die Tumor-B-Zelle zum Zeitpunkt ihrer Entartung befand und geben einen Hinweis, ob eine antigengetriebene Selektion stattgefunden haben könnte.

Unreife B-Zellen haben eine relativ geringe Mutationsfrequenz in den Bereichen der Antigenbindung (0,3%) (90) im Gegensatz zu B-Zellen, die mit dem Antigen in Kontakt (Affinitätsreifung) gestanden haben (B-Gedächtniszellen 4%.) (91).

Die Tumorsequenzen des untersuchten Vκ-Gens des Patienten WS wiesen Mutationsraten von 5,04 - 6,2% auf und liegen damit nur geringfügig über denen von Gedächtniszellen. Es handelt

sich bei den Tumorzellen vermutlich um Keimzentrumszellen, die somit an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben.

Das Lymphom V_H-Gen des Patienten LB liegt mit einer Mutationsrate von 13,4% deutlich über den für humane V_H-Gene typischen Werten. Auch die Mutationsfrequenz des rearrangierten V λ -Gens (10,7-11,1%) ist eindeutig höher. Hier ist davon auszugehen, daß die Tumorzellen länger als üblich an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben, da im Gegensatz zu Schafen beim Menschen keine antigen- und keimzentrumsunabhängige Hypermutation beschrieben wurde (92). Wann das transformierende Ereignis stattfand, ist aus der Betrachtung der Mutationszahlen allein nicht ersichtlich.

Selektionierte B-Zell-Klone weisen eine typische Mutationsverteilung mit Bevorzugung der die Proteinstruktur verändernden Austauschmutationen (*replacement*) in den CDRs und einer Anhäufung von stummen (*silent*) Mutationen in den strukturbewahrenden Bereichen (FRs) auf.

Nach der Annahme von Jukes & King (93) treten nicht selektionierte Mutationen folglich zufällig über das gesamte Gen verteilt auf, ohne besondere Abschnitte des Gens zu bevorzugen. Aus den 61 aminosäurekodierenden Triplets errechneten sie alle Mutationsmöglichkeiten für stumme als auch für Austauschmutationen. Für nicht selektionierte, also zufällig auftretende, Mutationen ergab sich eine R/S-Ratio von 2,9. Liegt nun das Verhältnis der Austausch- zu den stummen Mutationen in einem Genabschnitt, insbesondere in den CDRs, über diesem Wert, kann von einem selektionierten Vorgang ausgegangen werden. Werte unter 2,9 sprechen eher für einen Erhalt der Proteinstruktur.

Chang & Casali (95) ergänzten diese Theorie, da sie feststellten, daß vornehmlich in der CDR1 aminosäurekodierende Triplets anzutreffen sind, die überdurchschnittlich häufig zu einer Austauschmutation führen. Deshalb wird der Vergleich der R/S-Ratios der mutierten Immunglobulingene mit der intrinsischen R/S-Ratio der entsprechenden Keimbahnsequenz vorgezogen, die sich aus der Addition der Wahrscheinlichkeiten für jedes vorkommende Triplet ergibt (siehe Ergebnisse).

Shlomchik *et al.* (94) entwickelten daraus eine Formel mit der die Wahrscheinlichkeit (q), daß eine R-Mutation in den CDRs zufällig auftritt, für das vorliegende Gen berechnet werden kann. Man multipliziert den statistischen Anteil der Austauschmutationen (R_f) an allen möglichen Mutationen mit der relativen Größe der CDRs (*rel. Gr._{CDR}*) zum gesamten Gen und den insgesamt tatsächlich aufgetretenen Mutationen (n). Daraus ergibt sich die erwartete Anzahl an R-Mutationen in den CDRs. Diese kann mit den beobachteten verglichen werden. Liegt der

beobachtete Wert oberhalb des erwarteten, kann von einer positiven Selektion gesprochen werden (Tabellen 17, 18). Zusätzlich kann eine eventuelle Gegenselektionierung in den FRs in Betracht gezogen werden. Hier können Werte den Beweis einer Selektion unterstützen, wenn die tatsächlich beobachteten R-Mutationen unter den berechneten liegen. Eine Zusammenfassung der Mutationsanalyse für beide untersuchten Patienten zeigen die Tabellen 17 und 18.

Die jeweils letzte Spalte der Tabellen zeigt eine zusätzlich erarbeitete Formel (*binominal probability model*), die angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit (p) ist, daß die beobachtete Verteilung der R-Mutationen ohne Selektionsdruck, also zufällig entstanden ist. Hohe Werte sprechen eher für einen unselektionierten Vorgang, kleine Werte für eine selektionierte Mutationsverteilung (94).

Für den Patienten WS zeigt die Auswertung der absoluten R/S-Ratios in den CDRs der V κ -Gene aller gefundenen Subklone Werte im Bereich zwischen 1 - 2,7. Diese liegen unterhalb der intrinsischen R/S-Ratio des am meisten homologen Keimbahnogens (R/S_{CDR} 3,37). Mit alleiniger Betrachtung dieser Werte könnte ein selektionierter Mutationsvorgang nicht bestätigt werden. Die Notwendigkeit, andere Auswertungsmethoden zur Analyse der somatischen Hypermutation hinzuzuziehen, ist hier gegeben. Es besteht die Möglichkeit, daß der Tumor von Zellen abstammt, die sich am Anfang der Keimzentrumsreaktion befanden. Das Fehlen von R-Mutationen in den FRs und die sich somit ergebenden R/S-Ratios von 0, die deutlich unter dem intrinsischen Wert liegen, deuten auf einen die Struktur konservierenden Vorgang hin. Es ist zu erwähnen, daß die errechneten intrinsischen Werte für die FRs tendenziell zu hoch angesetzt werden, da nach Shlomchik *et al.* (94) ca. die Hälfte der theoretisch möglichen R-Mutationen strukturell nicht akzeptabel wären.

Vergleicht man nun die beobachteten R-Mutationen in den CDRs mit den errechneten, erwarteten R-Mutationen in diesen Bereichen, kann man eine überdurchschnittliche Anhäufung von R-Mutationen ausmachen. Statistisch erwartet wurden, in Abhängigkeit vom Subklon, 3 - 4 Austauschmutationen. Die tatsächlich beobachtete Anzahl von 5, 6, 7 bzw. 8 R-Mutationen liegt jeweils über der errechneten. Die mit dem *binominal probability model* errechnete Wahrscheinlichkeit (p), daß von insgesamt 13 Mutationen die 6 R-Mutationen in den CDRs zufällig entstanden sind, beträgt bei der Sequenz WSV κ 3A lediglich 0,043. Das bedeutet, die vorliegende Verteilung fände in 4 von 100 Fällen zufällig statt. Bei den Sequenzen WSV κ 3B und C liegt die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Verteilung nur bei 1-2%, bei Sequenz WSV κ 3D bei 10%.

Die gegenüber dem erwarteten Wert erhöhte Anzahl von R-Mutationen in den CDRs sowie die, zumindest in drei von vier Fällen, sehr geringe Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Verteilung und die nicht vorhandenen Austauschmutationen in den FRs sprechen, zusammenfassend betrachtet, für eine selektionierte Mutationsverteilung. Eine antigengetriebene Entstehung der hier vorliegenden intraklonalen Diversität ist folglich denkbar. Da der Nachweis von sogenannten andauernden Mutationen (*ongoing mutations*) mit der Entnahme von Biopsien zu ein und demselben Zeitpunkt nicht möglich ist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Hypermutationsprozeß am Tag der Untersuchung noch aktiv war.

In Zusammenhang mit der Analyse von somatischen Punktmutationen soll ein interessanter Aspekt in bezug auf Änderungen in der Proteinsequenz erwähnt werden. Die Austauschmutationen bei Patient WS konzentrieren sich bevorzugt auf den Bereich der CDR 1. Betrachtet man an zwei speziellen Stellen die entsprechende Änderung der Aminosäuresequenz, fällt auf, daß in Subklon WSV κ 3B durch den Nukleotidaustausch an Position 28 (AGT \rightarrow CGT) die Aminosäure Arginin anstatt Serin kodiert wird. Derselbe Aminosäureaustausch (Serin mit Arginin) ist in Subklon WSV κ 3C (AGC \rightarrow AGA) an Position 31 zu finden. Die beiden Austauschmutationen haben eine Schlüsselrolle, weil sie zur intraklonalen Diversität beitragen.

Bei der Untersuchung von Autoantikörpern (u. a. von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes) konnte, vor allem in den CDR-Bereichen, eine Bevorzugung der Aminosäuren Asparagin und Arginin in Austauschmutationen gefunden werden (96). Es wurde festgestellt, daß diese Aminosäuren entscheidend sind für Wechselwirkung und Bindung an DNA-Molekülen (94).

Das Auftreten in den Subklonen bei Patient WS bzw. in den die intraklonale Diversität bedingenden Austauschmutationen könnte einen Hinweis geben, daß DNA als Autoantigen möglicherweise eine antigene Determinante darstellt. Auch die Lokalisation in der CDR 1 unterstützt die These einer antigengetriebenen Selektion, der Tumorklonentwicklung bei Patient WS.

Betrachtet man die Ergebnisse der Mutationsanalyse der Schwer- und Leichtkettengene für Patient LB auf die gleiche Weise, ist zu sehen, daß die R/S-Ratio der Sequenz LBV μ 4A in den CDRs (\Rightarrow 2,25) ebenfalls unter der intrinsischen R/S-Ratio des Keimbahngens (\Rightarrow 4,61) liegt. Die Anzahl der beobachteten R-Mutationen (\Rightarrow 9) ist geringfügig höher als die der erwarteten (\Rightarrow 7). Auch die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Verteilung von über 10% läßt keine statistisch signifikante Aussage über einen antigen-selektierten Mutationsprozeß zu.

Für die leichte Kette der Immunglobulingene ergibt sich folgendes Mutationsmuster. Für Sequenz LBV λ 3ba sind die beobachteten R-Mutationen (\Rightarrow 10) ebenfalls höher als die theoretisch erwarteten (\Rightarrow 7). Hier liegt auch die tatsächliche R/S-Ratio der CDRs (\Rightarrow 10) deutlich über der intrinsischen des Keimbahngens (\Rightarrow 4,34). Die Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit, 10 R-Mutationen von insgesamt 27 Mutationen in den CDRs zu finden, liegt bei 0,072. Analysiert man Sequenz LBV λ 3bd ergibt sich ein ähnliches Bild. Auffällig ist, daß die R/S-Ratio dieser Sequenz nur 5 beträgt und die Ursache eine einzige zusätzliche stumme Mutation ist. Es soll hier auf die Problematik der statistischen Betrachtungsweise von Mutationsmustern hingewiesen werden.

Durch die alleinige R/S-Ratio-Analyse kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da es sich hier um statistisch sehr kleine Zahlen handelt. Wie das zuletzt beschriebene Beispiel zeigt, kann eine einzige stumme Mutation den Quotienten erheblich verändern und aus einem vermeintlich selektioniertem Wert von 10/1 ergibt sich ein unselektionierter von 10/2=5.

Zu beachten ist weiterhin die Tatsache, daß es durchaus unterschiedliche Auffassungen gibt, welche Aminosäuren an der Antigenbindung beteiligt sind, u.a. MacCallum *et al.* (97) veröffentlichte die sogenannte *contact definition* = CD, bei der die antigenbindenden Regionen nicht mit der Einteilung von Kabat *et al.*(28) übereinstimmen. Eine abweichende Betrachtung der antigenbindenden Bereiche kann zwangsläufig eine nicht unerhebliche Änderung der statistisch errechneten Werte und deren Aussage zur Folge haben.

Auch ist nicht genau geklärt, welche Mutationen die Affinität zum Antigen tatsächlich erhöhen. Es ist vorstellbar, daß auch Austauschmutationen in den FRs durch eine Strukturänderung eine bessere Antigen-Bindung bewirken können, bzw. daß eine einzige Mutation in den CDRs ausreicht, um einen optimal passenden Antikörper zu produzieren. Nachweislich vermögen auch Antikörper in Keimbahnkonfiguration Antigene hoch-affin zu binden (98).

Statistische Mutationsanalysen der variablen Abschnitte der Immunglobulingene können folglich einen selektionierten Mutationsprozeß nicht beweisen, aber bei ganzheitlicher Betrachtung Hinweise geben und so einen Anreiz darstellen, eine Antigen-Stimulation als Auslöser bei primär kutanen Lymphomen in Erwägung zu ziehen bzw. zu untersuchen.

Tabelle 17: : Statistische Mutationsanalysen der Tumorgensequenzen von Patient WS

	Mutations- frequenz Mutationen/ analysierte Basen	Region/ relative Größe	Mutationen/ beobachtet		R/S	Mutationen/ erwartet		intrinsische R/S	p $[n!/k!(n-k)!] \times q^k \times (1-q)^{n-k}$
			R	S		R n x rel. Gr. x Rf	S n x rel. Gr. x Sf		
WSVκ3A	13/258 5.04%	CDR 78/258=0,302	6	4	1,5	13 x 0,302 x 0,771 3,03	13 x 0,302 x 0,229 0,89	172/51 3,37	0,043
		FR 180/258=0,698	0	3	0	13 x 0,698 x 0,755 6,85	13 x 0,698 x 0,245 2,22	391/127 3,08	
WSVκ3B	14/258 5,43%	CDR 78/258=0,302	7	4	1,75	14 x 0,302 x 0,771 3,26	14 x 0,302 x 0,229 0,97	172/51 3,37	0,019
		FR 180/258=0,698	0	3	0	14 x 0,698 x 0,755 7,38	14 x 0,698 x 0,245 2,39	391/127 3,08	
WSVκ3C	16/258 6,20%	CDR 78/258=0,302	8	3	2,67	16 x 0,302 x 0,771 3,73	16 x 0,302 x 0,229 1,11	172/51 3,37	0,013
		FR 180/258=0,698	0	5	0	16 x 0,698 x 0,755 8,43	16 x 0,698 x 0,245 2,74	391/127 3,08	
WSVκ3D	13/258 5.04%	CDR 78/258=0,302	5	5	1	13 x 0,302 x 0,771 3,03	13 x 0,302 x 0,229 0,89	172/51 3,37	0,106
		FR 180/258=0,698	0	3	0	13 x 0,698 x 0,755 6,85	13 x 0,698 x 0,245 2,22	391/127 3,08	

(Zeichenerklärung: s. Tabelle 18)

Tabelle 18: : Statistische Mutationsanalysen der Tumorgensequenzen von Patient LB für die schwere und leichte Kette

	Mutations- frequenz Mutationen/ analysierte Basen	Region/ relative Größe	Mutationen/ beobachtet		R/S	Mutationen/ erwartet		intrinsische R/S	p $[n!/k!(n-k)!] \times q^k \times (1-q)^{n-k}$
			R	S		R n x rel. Gr. x Rf	S n x rel. Gr. x Sf		
LBV_H4A	29/216 13,4%	CDR 63/216=0,292	9	4	2,25	29 x 0,292 x 0,822 6,96	29 x 0,292 x 0,178 1,51	143/31 4,61	0,109
		FR 153/216=0,708	10	6	1,67	29 x 0,708 x 0,732 15,03	29 x 0,708 x 0,268 5,5	322/118 2,73	
LBVλ3b a	27/252 10,7%	CDR 81/252=0,321	10	1	10	27 x 0,321 x 0,813 7,05	27 x 0,321 x 0,187 1,62	191/44 4,34	0,0723
		FR 171/252=0,679	10	6	1,67	27 x 0,679 x 0,743 13,62	27 x 0,679 x 0,257 4,71	365/126 2,9	
LBVλ3b d	28/252 11,1%	CDR 81/252=0,321	10	2	5	28 x 0,321 x 0,813 7,31	28 x 0,321 x 0,187 1,68	191/44 4,34	0,0831
		FR 171/252=0,679	10	6	1,67	28 x 0,679 x 0,743 14,13	28 x 0,679 x 0,257 4,89	365/126 2,9	

n: Gesamtzahl der Mutationen

rel. Gr.: relative Größe

Rf o. Sf: statistischer Anteil der R- oder S-Mutationen an allen möglichen Mutationen in den CDRs bzw. FRs

k: Anzahl beobachteter R-Mutationen in den CDRs

q: Wahrscheinlichkeit, daß eine Mutation als R-Mutation in den CDRs auftritt; q = rel. Gr. x Rf

p: Wahrscheinlichkeit, daß die vorliegenden R-Mutationen in den CDRs zufällig so verteilt sind (binomiales Wahrscheinlichkeitsmodell) (94)

5.3 Methode

Die Molekularbiologie und Genetik halten immer mehr Einzug in die medizinische Forschung, um Zusammenhänge und Ursachen von Krankheitsentstehung aufzuzeigen, Behandlungsmethoden zu entwickeln und eine effiziente Diagnostik zu ermöglichen. Die angewendeten Verfahren erfuhren in den letzten Jahrzehnten enorme Entwicklungsschritte, und so ist es heute möglich geworden, Analysen auf DNA-Ebene durchzuführen.

Mit der Entdeckung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), also der Amplifikation von DNA-Molekülen durch wiederholte Polymerisationszyklen mit Hilfe von Oligonukleotiden und einer DNA-Polymerase (49;52), ergab sich eine Möglichkeit, die kleinste Baueinheit von Lebewesen zu erforschen. Die *in vitro* Vervielfältigung und Analyse von DNA aus Einzelzellen (Spermien) gelang erstmalig durch Li *et al.* (50). Die Entwicklung der Mikromanipulation von Zellpopulationen aus einem histologischen Gewebeverband mit sich anschließender PCR (67) mündete in die heutige Möglichkeit, sogar Einzelzellen aus ihrem histologischen Kontext zu isolieren und deren DNA mittels PCR und Direktsequenzierung zu untersuchen (99).

In der Lymphomdiagnostik werden die physiologisch variablen Genabschnitte der rearrangierten Immunglobuline analysiert und anhand eines Monoklonalitätsnachweises als maligne eingestuft.

Untersuchungen auf Einzelzellniveau haben entscheidende Vorteile gegenüber den häufig praktizierten Populationsanalysen.

Die Einzel-Zell-PCR-Technik erlaubt es, nicht mehr nur qualitativ, die Monoklonalität einer Lymphozytenpopulation nachzuweisen, sondern quantitativ, in enger Korrelation mit Zytologie und Lage im Tumorgewebe, exakte Aussagen über spezifische Zellen machen zu können. Andere Methoden, wie z.B. die Southern-Blot-Hybridisierung, bei der DNA aus den zu untersuchenden Zellen präpariert sowie mit Restriktionsendonukleasen verdaut wird und anschließend die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente nach einem Transfer auf eine Nylonmembran mittels Hybridisierung mit markierten Gensonden sichtbar gemacht werden (1), erwies sich als ein technisch aufwendiges Verfahren. Ein weiterer Nachteil ist der relativ große Bedarf (μg -Bereich) an gut erhaltener DNA bei relativ geringer Sensitivität.

Auch bei der in der Routinediagnostik eingesetzten PCR von Zellpopulationen aus dem Blut oder aus Biopsiematerial (also einem DNA-Gemisch) stellte sich der Monoklonalitätsnachweis als problematisch heraus, vor allem wenn der Anteil der tumorspezifischen an der Gesamt-DNA sehr gering ist. Bei beiden Verfahren müssen ca. 1%-5% klonale Zellen vorhanden sein, um die

Nachweisgrenze zu überschreiten (43). Ein Grund dafür ist, daß DNA aus gleichzeitig vorhandenen reaktiven Lymphozyten ebenfalls mit den verwendeten Oligonukleotiden hybridisieren und amplifiziert werden kann, so daß das monoklonale PCR-Produkt in der Elektrophorese nicht erkannt wird. Auch die artifizielle Hybridbildung, die auftreten kann, wenn beim Amplifikationsprozeß ähnliche Moleküle (wie z.B. rearrangierte Immunglobulingene) in einem Reaktionsgefäß vorliegen, ist ein Nachteil zur Beurteilung intraklonal diverser Gene. Hybride Moleküle können sich aus verschiedenen, die V-Region kodierenden Genen oder aus Mutationsvarianten gleicher Gene zusammensetzen und machen eine zuverlässige Sequenzanalyse nicht mehr möglich, weil sie häufig schwer zu identifizieren sind (41;43).

Einzelzell-Produkte können direkt, ohne Klonierung in Plasmiden, sequenziert werden, da sie ein individuelles Rearrangement repräsentieren, das nur in einer Kopie vorliegt. Sequenzartefakte, die auf Fehlern der Taq-DNA-Polymerase bei PCR-Produkten, die vor der Sequenzierung kloniert werden, beruhen und so die Identifikation von Punktmutationen in rearrangierten V-Genen erschweren, sind bei der Direktsequenzierung einer Einzelzelle vernachlässigbar (44).

Mit Hilfe der Einzel-Zell-PCR-Technik lassen sich die untersuchten Lymphomzellen nicht nur bezüglich der Lage im Gewebeverband definieren, sondern es kann auch eine zuverlässige Aussage über intraklonale Diversität getroffen werden.

Für die Analyse von antigen-selektionierten Hypermutationen ist es ebenfalls von großer Bedeutung, daß in ein und derselben Zelle die Sequenzen für die schwere und die leichte Kette des Antikörpers amplifiziert und analysiert werden können (45). Nur so kann bewiesen werden, daß die Klone für die schwere und leichte Kette der Ig-Gene aus einer gemeinsamen Zellpopulation stammen.

Die Sensitivität der Methode bei der Diagnostik von B-Zell-Lymphomen liegt zwischen 70% und 90% und ist abhängig von den Bindungsstellen der verwendeten Primer (100). Jedoch beziehen sich die Daten auf Untersuchungen, bei denen die Lymphozytenpopulationen zuvor durch Southern-Blot-Hybridisierung als monoklonal bestätigt worden sind. An der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité Berlin können bei klinisch, immunhistochemisch und histologisch gesichertem Verdacht auf ein kutanes B-Zell-Lymphom, ca. 50% der Tumoren durch die PCR-Routine-Diagnostik als monoklonal identifiziert werden.

Bei den von uns untersuchten DNA-Abschnitten handelt es sich in der Regel um hypermutierte Regionen. Es ist vorstellbar, daß die verwendeten Oligonukleotidprimer, die anhand der unmutierten Keimbahngene entwickelt wurden, aufgrund von Mutationen in den

komplementären Bereichen nicht binden können. Keine Rolle spielt dabei, ob es sich um eine die Aminosäuresequenz verändernde Mutation handelt oder nicht. So liegt die Sensitivität der Methode für den Nachweis von unmutierten B-Zellen der CLL bei nahezu 100%, für die Keimzentrumszell-Lymphome nur bei bis zu 70% (100). Der fehlende Nachweis des Gen-Rearrangements für die schwere Kette bei Patient WS könnte in dieser Ursache begründet sein.

Dennoch ist die Sensitivität der Polymerase-Ketten-Reaktion in Abhängigkeit von der Anzahl der Zielmoleküle sehr hoch (51). Ein einziges Molekül ist ebenfalls nachweisbar, bedarf aber genau abgestimmter Reaktionsbedingungen. Die gewählte Temperatur der Zyklen und die Salzkonzentration sind entscheidende Parameter für den Erfolg und eine hohe Spezifität der Produkte (51). Die Temperatur zum Binden der Primer an den Zielmolekülen sollte möglichst hoch gewählt werden, da die Interaktion bei Raumtemperatur ungenau ist und die bei dieser Temperatur aktive Polymerase unspezifische Produkte amplifizieren könnte. Sind diese kleiner als das Ziel, werden sie effizienter produziert.

Die Anzahl falsch eingebauter Nukleotide während der PCR hängt nicht allein von Fehlern der DNA-Polymerase ab, sondern in erheblichem Maße von der gewählten dNTP-Konzentration. Im allgemeinen gilt für optimale PCR Bedingungen der Grundsatz, die *annealing*- und Extensionszeit zu minimieren, die Bindungstemperatur der Primer zu maximieren und eine kleinstmögliche Menge an dNTP und $MgCl_2$ zu verwenden. Die Steigerung der Genauigkeit der Reaktionsbedingungen geht mit Einbußen in der Effizienz einher.

Die Korrektheit der Taq-DNA-Polymerase ist erstaunlich hoch, die Fehlerrate bei der PCR liegt bei ca. 5×10^{-6} pro Zyklus, so haben lediglich 3% der Moleküle mit einer Länge von ca. 200 bp nach 30 Zyklen eine falsch eingebaute Base (51). Bei der Einzel-Zell-PCR-Technik mit anschließender Direktsequenzierung führt der Einbau einer fehlerhaften Base, selbst in der ersten Runde der PCR, lediglich zu einer Überlagerung im Elektropherogramm, anders als bei Klonierungen, wo auch die Fehlerrate kombiniert mit der PCR erheblich höher ist ($1,5 \times 10^{-3}$).

Es besteht die Möglichkeit, daß die bei Patient LB einmalig gefundenen Sequenzen mit lediglich einem unterschiedlichen Basenaustausch auf einen Polymerasefehler zurückzuführen sind oder das Elektropherogramm falsch interpretiert wurde. Aus dieser Beobachtung ergibt sich ein erheblicher Nachteil der verwendeten Methode. Die Ergebnisse sind nicht unmittelbar reproduzierbar. Ein einmalig gefundener Basenaustausch kann nicht bestätigt werden. Nur wenn sich das Ergebnis in zwei verschiedenen Zellen in unabhängigen PCR-Reaktionen wiederholt, ist die Zufälligkeit äußerst gering, und der Austausch kann als erwiesen gelten.

Kontaminationen von vorangegangenen Experimenten (PCR-Reaktionen oder Klonierungen) stellen das größte Problem dar. Ein verschwindend kleiner Anteil kontaminierender monoklonaler DNA kann das Amplifizieren des gewünschten Produktes verhindern. Es ist daher notwendig, die Mikromanipulation der Zellen und die erste Runde der PCR in einem anderen Raum durchzuführen, als die 2. Runde der PCR und die Analyse der Produkte. In dem Mikromanipulationsraum wurden nur der Zellkern und die Chemikalien für die 1. und 2. Runde pipettiert. Reaktionsgefäße mit amplifizierter DNA wurden nur in dem Raum geöffnet, in welchem die zweite Runde und die Sequenzierung erfolgte. Das Mitführen von Negativkontrollen ist unerlässlich, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen. Eine Sequenzdatenbank, die alle in unserem Labor amplifizierten Sequenzen enthält, half Kontaminationen größtenteils zu identifizieren. Bei den vorliegenden Ergebnissen enthielt keine der Negativkontrollen ein Produkt.

Die Effizienz der durchgeführten Einzelzellanalysen lag bei durchschnittlich 30% (WSK 24%, LB_L 27%, LB_H 36,5%) und entspricht den veröffentlichten Ergebnissen für reife mutierte B-Zellen (Keimzentrums- oder Nachkeimzentrumszellen) (99). Die vielfachen Bearbeitungsschritte, von der Mikromanipulation bis zur Sequenzanalyse, bieten viele Möglichkeiten für den Verlust des Produktes. Es wurden bereits die Gefahren der Kontamination und Bindungsschwierigkeiten der Oligonukleotide erwähnt. Weitere Ursachen können auch eine mechanische Degradierung der DNA bei der Mikromanipulation oder der vollständige Verlust beim Pipettieren, sowie mögliche Doppelstrangbrüche durch hohe Temperaturen sein.

Die Verknüpfung von Mikromanipulation, Einzel-Zell-PCR und anschließender Direktsequenzierung ist, trotz nicht unerheblichem Arbeits- und Kostenaufwand, eine Methode, die neue Dimensionen in der molekulargenetischen Forschung eröffnet.

Um Entwicklungsprozesse von B-Vorläuferzellen zu studieren, die klonale Beziehung von B-Lymphozyten in den peripher lymphatischen Organen zu bestimmen sowie den B-Lymphozytenursprung von Tumorzellen zu identifizieren, ist es von großem Wert, Einzelzellen zu isolieren und ihre Immunglobulingene zu charakterisieren.

Die Einzel-Zell-PCR-Technik liefert einen weiteren Baustein für den Erkenntnisgewinn in der Medizin zur Beantwortung von Fragestellungen, wie z.B. nach der Pathogenese von primär kutanen B-Zell-Lymphomen.

6 Zusammenfassung

Die molekularbiologischen Untersuchungen der variablen Genabschnitte der Immunglobulingene von Lymphomzellen zweier Patienten mit kutanen B-Zell-Lymphomen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Einzel-Zell-PCR-Technik durchgeführt. Die erfolgte Analyse galt bevorzugt dem Aspekt der intraklonalen Diversität.

Die Sequenzanalysen der Ig-Gene für die leichte Kette aus den insgesamt 100 untersuchten Tumorzellen des Patienten WS ergaben, daß zwischen den Zellen aus drei voneinander entfernt lokalisierten Gewebeproben intraklonale Diversität vorlag. Aufgrund der Mutationsanalysen und der Zuordnung der Subklone zu den Entnahmeorten ist eine evtl. antigengetriebene Entwicklung des Tumorklons zu vermuten.

Bei Patient LB konnte trotz des großen Aufwandes, der Untersuchung von insgesamt 126 Zellen aus acht räumlich getrennten Biopsien, keine intraklonale Diversität für die schwere Kette der Immunglobulingene aufgezeigt werden. Die Sequenzunterschiede der leichten Kette beruhen auf einer einzigen stummen Mutation im Bereich der CDR 1, die keinen funktionellen Einfluß auf die Aminosäuresequenz hat und deshalb geringe prognostische Bedeutung besitzt.

In beiden Fällen lagen hypermutierte Immunglobulingene vor. Die Tumorzellen des Patienten WS sind aus molekularbiologischer Sicht Keimzentrumszellen, die des Patienten LB eher Nachkeimzentrumszellen zuzuordnen. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, daß bei der Untersuchung und Erforschung der Pathogenese von kutanen B-Zell-Lymphomen **eine** gewonnene Gewebeprobe nicht repräsentativ für den gesamten Tumor sein muß. Veröffentlichte Ergebnisse, bei denen Monoklonalität anhand einer Biopsie postuliert wurde, müssen daher initial überdacht werden (74;76;77;84). Es ist folglich in Betracht zu ziehen, daß bei einer exakten molekularbiologischen Zuordnung der Tumorzellen zu ihrem Entwicklungsstadium und ihrer Herkunft räumliche als auch zeitliche Faktoren zu beachten sind. Eine chronologische Untersuchung könnte aufzeigen, ob andauernde Mutationen in den Tumorzellen stattfinden.

Die Mikromanipulation und die Einzel-Zell-PCR-Technik sind elegante Methoden, um intraklonale Sequenzunterschiede aufzuzeigen und einen Beitrag für die molekularbiologische Erforschung der Pathogenese von kutanen B-Zell-Lymphomen zu leisten. Eine Kontrolle von malignoproliferativen Krankheiten, ob es unter den heutigen Therapiemöglichkeiten gelingt, den malignen Tumorklon vollständig zu beseitigen oder Aussagen über Progredienz und Prognose zu treffen, wäre ein interessanter Einsatzbereich dieser Methode.

7 Literaturverzeichnis

1. **Jahn, S., M. Muche, A. Lukowsky, and W. Sterry.** 1997. Kutane maligne Lymphome Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Molekularbiologie. *H+G* 4:243.
2. **Isaacson, P.G.** 1992. Extranodal Lymphomas, *Verh Dtsch Ges Pathol.* 76:14-23
3. **Sterry, W. and S. Jahn.** 1995. Kutane maligne Lymphome. *H+G* 70:781.
4. **Cerroni, L., M. Volkenandt, E. Rieger, H.P. Soyer, and H. Kerl.** 1994. bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J.Invest.Dermatol.* 102:231.
5. **Stansfeld, A.G., J. Diebold, H. Noel, Y. Kapanci, F. Rilke, G. Kelenyi, C. Sundstrom, K. Lennert, J.A. van Unnik, O. Mioduszevska et al.** 1988. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1:292.
6. **Chan, J.K., P.M. Banks, M.L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf Peeters, B. Falini, K.C. Gatter, T.M. Grogan, N.L. Harris, P.G. Isaacson et al.** 1995. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms proposed by the International Lymphoma Study Group. A summary version. *Am.J.Clin.Pathol.* 103:543.
7. **Kerl, H., M. Volkenandt, and L. Cerroni.** 1994. Maligne Lymphome der Haut. *Hautarzt.* 45:421.
8. **Santucci, M., N. Pimpinelli, and L. Arganini.** 1991. Primary cutaneous B-cell lymphoma: a unique type of low-grade lymphoma. Clinicopathologic and immunologic study of 83 cases. *Cancer* 67:2311.
9. **Ritter, J.H., P.N. Adesokan, J.F. Fitzgibbon, and M.R. Wick.** 1994. Paraffin section immunohistochemistry as an adjunct to morphologic analysis in the diagnosis of cutaneous lymphoid infiltrates. *J.Cutan.Pathol.* 21:481.
10. **Staib, G. and W. Sterry.** 1995. Use of polymerase chain reaction in the detection of clones in lymphoproliferative diseases of the skin. *Recent.Results.Cancer Res.* 139:239.
11. **Burg, G., H. Kerl, and C. Schmoeckel.** 1984. Differentiation between malignant B-cell lymphomas and pseudolymphomas of the skin. *J.Dermatol.Surg.Oncol.* 10:271.
12. **Willemze, R., H. Kerl, W. Sterry, E. Berti, L. Cerroni, S. Chimenti, J.L. Diaz-Peréz, M.L. Geerts, M. Goos, R. Knobler, E. Ralfkiaer, M. Santucci, N. Smith, J. Wechsler, W.A. van Vloten, and C.J. Meijer.** 1997. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90:354.
13. **Sterry, W. and G. Staib.** 1995. Moderne molekularbiologische Diagnostik kutaner maligner Lymphome. *Hautarzt.* 46:4.
14. **Willemze, R., C.J. Meijer, H.J. Sentis, E. Scheffer, W.A. van Vloten, J. Toonstra, and S.C. van der Putte.** 1987. Primary cutaneous large cell lymphomas of follicular center cell origin. A clinical follow-up study of nineteen patients. *J.Am.Acad.Dermatol.* 16:518.
15. **Takeda, S., E. Sonoda, and H. Arakawa.** 1996. The kappa-lambda Ratio of Immature B Cells. *Immunol.Today* 200.
16. **Liu, Y.J., G.D. Johnson, J. Gordon, and I.C. MacLennan.** 1992. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol.Today* 13:17.

17. **Rijlaarsdam, J.U., S.C. van der Putte, E. Berti, H. Kerl, E. Rieger, J. Toonstra, M.L. Geerts, C.J. Meijer, and R. Willemze.** 1993. Cutaneous immunocytomas: a clinicopathologic study of 26 cases. *Histopathology* 23:117.
18. **Garbe, C., H. Stein, D. Dienemann, and C.E. Orfanos.** 1991. Borrelia burgdorferi-associated cutaneous B cell lymphoma: clinical and immunohistologic characterization of four cases. *J.Am.Acad.Dermatol.* 24:584.
19. **Rijlaarsdam, U., V. Bakels, J.W. van Oostveen, R.J. Gordijn, M.L. Geerts, C.J. Meijer, and R. Willemze.** 1992. Demonstration of clonal immunoglobulin gene rearrangements in cutaneous B-cell lymphomas and pseudo-B-cell lymphomas: differential diagnostic and pathogenetic aspects. *J.Invest.Dermatol.* 99:749.
20. **Slater, D.N.** 1994. MALT and SALT: the clue to cutaneous B-cell lymphoproliferative disease. *Br.J.Dermatol.* 131:557.
21. **Lennert, K.** 1992. Non-Hodgkin-Lymphome: Prinzipien und Anwendung der Kiel-Klassifikation. *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* 76:1.
22. **Willemze, R., J.U. Rijlaarsdam, and C.J. Meijer.** 1995. Are most primary cutaneous B-cell lymphomas 'marginal cell lymphomas'? *Br.J.Dermatol.* 133:950.
23. **Pimpinelli, N., M. Santucci, and B. Giannotti.** 1993. Cutaneous lymphoma: a clinically relevant classification. *Int.J.Dermatol.* 32:695.
24. **Geelen, F.A., M.H. Vermeer, C.J. Meijer, S.C. van der Putte, E. Kerkhof, P.M. Kluin and R. Willemze.** 1998. Bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. *J.Clin.Oncol.* 16/6:2080
25. **Bertero, M., M. Novelli, M.T. Fierro, and M.G. Bernengo.** 1994. Mantle zone lymphoma: an immunohistologic study of skin lesions. *J.Am.Acad.Dermatol.* 30:23.
26. **Harris, L.J., S.B. Larson, K.W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, and A. McPherson.** 1992. The 3-dimensional Structure of an Intact Monoclonal Antibody for Canine lymphoma. *Nature* 360: 369.
27. **Gilliland, L.K., N.A. Norris, H. Marquardt, T.T. Tsu, M.S. Hayden, M.G. Neubauer, D.E. Yelton, R.S. Mittler, and J.A. Ledbetter.** 1996. Rapid and Reliable Cloning of Antibody Variable Regions and Generation of Recombinant Single-chain Antibody Fragments. *Tissue Antigens* 1.
28. **Kabat, E.A. and T.T. Wu.** 1971. Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 190:382.
29. **Lin, W.C. and S. Desiderio.** 1995.V(D)J recombination and the cell cycle.*Immunol.Today* 16:279.
30. **Tonegawa, S.** 1993. Somatic Generation of Immune Diversity. *Scand.J.Immunol.* 305.
31. **Janeway, C.A., P. Travers, K. "aus dem Englischen übersetzt von : K. Beginnen, G. Bucher, E. Jarasch, and L. Seidler.** 1997. *Immunologie.* Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford
32. **Desiderio, S.V., G.D. Yancopoulos, M. Paskind, E. Thomas, M.A. Boss, N. Landau, F.W. Alt, and D. Baltimore.** 1984. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 311:752.
33. **Wagner, S.D. and M.S. Neuberger.** 1996. Somatic Hypermutation of Immunglobulin Genes.

34. **Tomlinson, I.M. and G. Walter.** 1996. The Imprint of Somatic Hypermutation on the Repertoire of Human Germline V Genes. *J.Mol.Biol.* 256:813.
35. **Rolink, A. and F. Melchers.** 1993. Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage. *Curr.Opin.Immunol.* 5:207.
36. **Rolink, A., J. Andersson, P. Ghia, U. Grawunder, D. Haasner, H. Karasuyama, E. ten Boekel, T.H. Winkler, and F. Melchers.** 1995. B-cell development in mouse and man. *The Immunologist* 3/4:125.
37. **Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y.J. Liu.** 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268:720.
38. **Isaacson, P.G.** 1992. Extranodal lymphomas: the MALT concept. *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* 76:14.
39. **Nagatani, T., M. Miyazawa, T. Matsuzaki, H. Hayakawa, G. Iemoto, S.T. Kim, N. Baba, M. Aihara, H. Miyamoto, H. Nakajima et al.** 1993. Cutaneous B-cell lymphoma - a clinical, pathological and immunohistochemical study. *Clin.Exp.Dermatol.* 18:530.
40. **Langman, R.E. and M. Cohn.** 1995. The proportion of B-cell subsets expressing kappa and lambda light chains changes following antigenic selection. *Immunol.Today* 16:141.
41. **Ford, J.E., M.G. McHeyzer Williams, and M.R. Lieber.** 1994. Chimeric molecules created by gene amplification interfere with the analysis of somatic hypermutation of murine immunoglobulin genes. *Gene* 142:279.
42. **Arnold, A., J. Cossman, A. Bakhshi, E.S. Jaffe, T.A. Waldmann, and S.J. Korsmeyer.** 1983. Immunoglobulin-gene rearrangement as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *New England Journal of Medicine* 1593.
43. **Lehman, C.M., C. Sarago, S. Nasim, J. Comerford, D.S. Karcher, and C.T. Garrett.** 1995. Comparison of PCR with southern hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Am.J.Clin.Pathol.* 103:171.
44. **Ichihara, Y., H. Matsuoka, and Y. Kurosawa.** 1988. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J.* 7:4141.
45. **Ehrlich, A. and R. Kuppers.** 1995. Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. *Curr.Opin.Immunol.* 7:281.
46. **Delabie, J., A. Tierens, G. Wu, D.D. Weisenburger, and W.C. Chan.** 1994. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: lineage and clonality determination using a single-cell assay. *Blood* 84:3291.
47. **Kuppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, G. Simons, R. Laumann, R. Fischer, and M.L. Hansmann.** 1994. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:10962.
48. **Kuppers, R., A. Gause, and K. Rajewsky.** 1991. B cells of chronic lymphatic leukemia express V genes in unmutated form. *Leuk.Res.* 15:487.
49. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1:263.
50. **Li, H.H., U.B. Gyllensten, X.F. Cui, R.K. Saiki, H.A. Erlich, and N. Arnheim.** 1988.

- Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335:414.
51. **Arnheim, N. and H. Erlich.** 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu.Rev.Biochem.* 61:131.
 52. **Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487.
 53. **Kuppers, R., M.L. Hansmann, and K. Rajewsky.** 1997. Micromanipulation and PCR analysis of single cells from tissue sections. In *Handbook of Experimental Immunology*. 5 ed. D.M. Weir, C. Blackwell and L.A. Herzenberg, eds. Blackwell Scientific, Oxford, p. 206.1.
 54. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463.
 55. **Barbie, V. and MP. Lefranc.** 1998. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Exp Clin Immunogenetics* 15/3:171.
 56. **Cox, GP., IM. Tomlinson, and G. Winter.** 1994. A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur J Immunol* 24:827.
 57. **Lefranc, MP.** 1998. IGMT (ImMinoGeneTics) locus on focus. A new section of Experimental and Clinical Immunogenetics. *Exp Clin Immunogenetics* 15/1:1.
 58. **Pallares, N., JP. Fripiat, V. Giudicelli, and MP. Lefranc.** 1998. The human immunoglobulin lambda variable (IGLV) genes and joining (IGLJ) segments. *Exp Clin Immunogenetics* 15/1:8.
 59. **Daley, M.D., H.Q. Peng, V. Misener, X.Y. Liu, P.P. Chen, and K.A. Siminovitch.** 1992. Molecular Analysis of the Human V lambda Germline Genes: Subgroups V lambda III and V lambda IV. *Mol.Immunol.* 29:1515.
 60. **Sanz, I.** 1991. Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J.Immunol.* 147:1720.
 61. **Volkenandt, M. et al.** 1991. Die Polymerasekettenreaktion mit nachfolgender direkter Gensequenzanalyse. *Hautarzt.* 700.
 62. **Stingl, G., C. Hauser, and K. Wolff.** 1993. The epidermis: an immunologic microenvironment. In *Dermatology in general medicine*. 4 ed. T.B. Fitzpatrick, A.Z. Eisen, K. Wolff, I.M. Freedberg and K.F. Austen, eds. McGraw-Hill, p. 172.
 63. **Pileri, S.A., L. Leoncini, and B. Falini.** 1995. Revised European-American Lymphoma Classification. *Curr.Opin.Oncol.* 7:401.
 64. **MacLennan, I.C.** 1994. Germinal Centers. *Annu.Rev.Immunol.* 12:117.
 65. **Szakai, A.K. and J.G. Tew.** 1992. Follicular dendritic cells: B-cell proliferation and maturation. *Cancer Res.* 52:5554s.
 66. **Hentges, F.** 1994. B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin.Exp.Immunol.* 97 Suppl 1:3.
 67. **Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky, and U. Weiss.** 1991. Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354:389.
 68. **Berek, C., A. Berger, and M. Apel .** 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67:1121.

69. **Kelsoe, G.** 1996. Life and Death in Germinal Centers. *Immunity* 4:117.
70. **Du, M., T.C. Diss, C. Xu, H. Peng, P.G. Isaacson, and L. Pan.** 1996. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia* 10:1190.
71. **Qin, Y., A. Greiner, M.J. Trunk, B. Schmausser, M.M. Ott, and H.K. Muller Hermelink.** 1995. Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. *Blood* 86:3528.
72. **Giannotti, B. and M. Santucci.** 1993. Skin-associated lymphoid tissue (SALT)-related B-cell lymphoma (primary cutaneous B-cell lymphoma). A concept and a clinicopathologic entity. *Arch.Dermatol.* 129:353.
73. **Bakkus, M.H., C. Heirman, Van Riet I, B. Van Camp, and K. Thielemans.** 1992. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 80:2326.
74. **Kuppers, R., M. Hajadi, L. Plank, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann.** 1996. Molecular Ig gene analysis reveals that monocytoid B cell lymphoma is a malignancy of mature B cells carrying somatically mutated V region genes and suggests that rearrangement of the kappa-deleting element (resulting in deletion of the Ig kappa enhancers) abolishes somatic hypermutation in the human. *Eur.J.Immunol.* 26:1794.
75. **Klein, U., G. Klein, B. Ehlin Henriksson, K. Rajewsky, and R. Kuppers.** 1995. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol.Med.* 1:495.
76. **Gellrich, S., S. Golembowski, H. Audring, S. Jahn, and W. Sterry.** 1997. Molecular analysis of the immunoglobulin VH gene rearrangement in a primary cutaneous immunoblastic B-cell lymphoma by micromanipulation and single-cell PCR. *J.Invest.Dermatol.* 109:541.
77. **Hummel, M., J. Tamaru, B. Kalvelage, and H. Stein.** 1994. **Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle.** *Blood* 84:403.
78. **Kanzler, H., R. Kuppers, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky.** 1996. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J.Exp.Med.* 184:1495.
79. **Kuppers, R., K. Rajewsky, and M.L. Hansmann.** 1997. Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur.J.Immunol.* 27/6:1398
80. **Bahler, D.W. and R. Levy.** 1992. Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:6770.
81. **Zhu, D., R.E. Hawkins, T.J. Hamblin, and F.K. Stevenson.** 1994. Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes. *Br.J.Haematol.* 86:505.
82. **Berek, C. and C. Milstein.** 1988. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol.Rev.* 105:5.
83. **Golembowski, S.** 1997 Mikromanipulation und Einzelzellanalysen an Kutanen B-Zell-Lymphomen. 1-85. *Humboldt-Universität zu Berlin. (GENERIC)*
84. **Aarts, W.M., R. Willemze, R.J. Bende, C.J.L.M. Meijer, S.T. Pals, and C.J.M. vNoesel.** 1998. VH Gene Analysis of Primary Cutaneus B-Cell Lymphomas: Evidence for Ongoing

Somatic Hypermutation and Isotype Switching. *Blood* 92:3857.

85. **Kuppers, R., M. Zhao, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann.** 1993. Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 143:230.
86. **Kuppers, R., K. Willenbrock, K. Rajewsky, and M.L. Hansmann.** 1995. Detection of clonal lambda light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 147:806.
87. **Cook, G.P. and I.M. Tomlinson.** 1995. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol.Today* 16:237.
88. **Pezzella, F., A.G. Tse, J.L. Cordell, K.A. Pulford, K.C. Gatter, and D.Y. Mason.** 1990. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am.J.Pathol.* 137:225.
89. **Cerroni, L., S. Signoretti, B. Kutting, G. Annessi, D. Metze, A. Giannetti, and H. Kerl.** 1996. Marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *J.Cutan.Pathol.* 23:47.(Abstract)
90. **Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky.** 1993. Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur.J.Immunol.* 23:3272.
91. **Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky.** 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in human. *Blood* 89:1288.
92. **Reynaud, C.A., C. Garcia, W.R. Hein, and J.C. Weill.** 1995. Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 80:115.
93. **Jukes, T.H. and J.L. King.** 1979. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature* 281:605.
94. **Shlomchik, M.J., A.H. Aucoin, D.S. Pisetsky, and M.G. Weigert.** 1987. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:9150.
95. **Chang, B. and P. Casali.** 1994. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol.Today* 15:367.
96. **Winkler, T.H., H. Fehr, and J.R. Kalden.** 1992. Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *Eur.J.Immunol.* 22:1719.
97. **MacCallum, R.M., A.C.R. Martin, and J.M. Thornton.** 1996. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J.Mol.Biol.* 262:732.
98. **Pascual, V., K. Victor, I. Randen, K. Thompson, J.B. Natvig, and J.D. Capra.** 1992. IgM rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis derive from a diverse array of germline immunoglobulin genes and display little evidence of somatic variation. *J.Rheumatol.Suppl.* 32:50.
99. **Kuppers, R., M. Zhao, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky.** 1993. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* 12:4955.
100. **Diss, T.C., H. Peng, A.C. Wotherspoon, P.G. Isaacson, and L. Pan.** 1993. Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J.Pathol.* 169:291.

8 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CD	a) <i>cluster of differentiation</i> / b) <i>contact definition</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DCLWG	<i>Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group</i>
D	<i>diversity</i> -Fragment
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
Fab:	antigenbindendes Fragment
Fc:	<i>Fragment crystallizable</i>
FDC	<i>follicular dendritic cells</i> (follikulär dendritische Zellen)
FR	<i>framework region</i>
HV	hypervariable Region
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JÜR	Jahres-Überlebensrate
KKZL	kutanes Keimzentrumszell-Lymphom
J	<i>joining</i> -Fragment
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PAS	<i>Periodic Acid Schiff reaction</i> (Periodsäure-Leukofuchsin-Reaktion)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKBZL	Primär kutanes B-Zell-Lymphom
RAG	rekombinationsaktivierende Gene
REAL	<i>Revised European-American Lymphoma (Classification)</i>
SALT	<i>skin-associated lymphoid tissue</i>
SBH	Southern-Blot-Hybridisierung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
V _H	variable Domäne der schweren (<i>heavy</i>) Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im November 1999

Claudia Jacobs

Danksagung

Dem Klinikdirektor, Herrn Prof. Dr. med. W. Sterry, danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit, an der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité den experimentellen Teil der Promotion durchführen zu können.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. med. S. Jahn, mich für diese Arbeit motiviert zu haben, desweiteren für die Aufarbeitung der experimentellen Ergebnisse und die wissenschaftlichen Denkansätze.

Herrn S. Rutz danke ich im speziellen für die Unterstützung bei allen technischen Problemen, der kritischen Stellungnahme und Korrektur meiner schriftlichen Arbeit.

Frau Dr. med. S. Gellrich gilt mein Dank für die Förderung der molekularbiologischen Arbeit im Labor.

Für die histologische Beratung bedanke ich mich bei Frau Dr. H. Audring und für das Schneiden und Anfärben der Präparate bei Frau P. Lorenz.

Allen Mitarbeitern der Labore in der Charité-Hautklinik danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Die experimentellen Arbeiten wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Forschergruppen-Projekt „Kutane Lymphome“).

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Claudia Jacobs
geboren	5.März 1974 in Berlin

Schulbildung

1980-1986	Franz-Marc-Grundschule - Berlin
1986-1993	Gabriele-von-Bülow-Gymnasium - Berlin
1993	Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin

1994-1996	Freie Universität zu Berlin
1996	Ärztliche Vorprüfung und Wechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin
1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1999	Beginn des Praktischen Jahres (PJ)

Studienbegleitende Tätigkeit

1997-1999	Dozentin an der Krankenpflegeschule des Humboldt-Krankenhauses Reinickendorf
-----------	--

Veröffentlichungen

Abstracts

S. GELLRICH, S. GOLEMBOWSKI, S. LIPPERT, S. RUTZ, P. LORENZ, **C. JACOBS**, W. STERRY, S. JAHN: Molecular analysis of cutaneous B cell lymphomas by micromanipulation and single cell PCR in six patients. *J. Invest. Dermatol.* 110, 1998, 621 A302

(International Investigative Dermatology 1998, Köln)

S. RUTZ, S. GELLRICH, P. LORENZ, S. LIPPERT, **C. JACOBS**, S. GOLEMBOWSKI, H. AUDRING, W. STERRY, S. JAHN: Single cell approach to the molecularbiological characterization of eight cutaneous B-cell lymphomas. *Arch Dermatol Res.* 1999, 291, 162 (P147)

(ADF 1999, Bonn)

S. RUTZ, S. GELLRICH, P. LORENZ, **C. JACOBS**, S. GOLEMBOWSKI, M. V. ZIMMERMANN, S. LIPPERT, H. AUDRING, W. STERRY, S. JAHN: Primary cutaneous B-cell lymphomas are descended from germinal center B cells. A molecularbiological characterization on the single cell level. *J Invest. Dermatol.* 112 (4), 1999, 630 A648

(SID Chicago 1999)